

## PCT INTERNATIONAL COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
 United States Patent and Trademark  
 Office  
 Box PCT  
 Washington, D.C. 20231  
 ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

<b>Date of mailing</b> (day/month/year) 08 November 1999 (08.11.99)	
<b>International application No.</b> PCT/JP99/02283	<b>Applicant's or agent's file reference</b> ONF-2969PCT
<b>International filing date</b> (day/month/year) 28 April 1999 (28.04.99)	<b>Priority date</b> (day/month/year) 28 April 1998 (28.04.98)
<b>Applicant</b> HONJO, Tasuku et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:  
 13 October 1999 (13.10.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:  
 \_\_\_\_\_

2. The election ☒ was  
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO  
 34, chemin des Colombettes  
 1211 Geneva 20, Switzerland

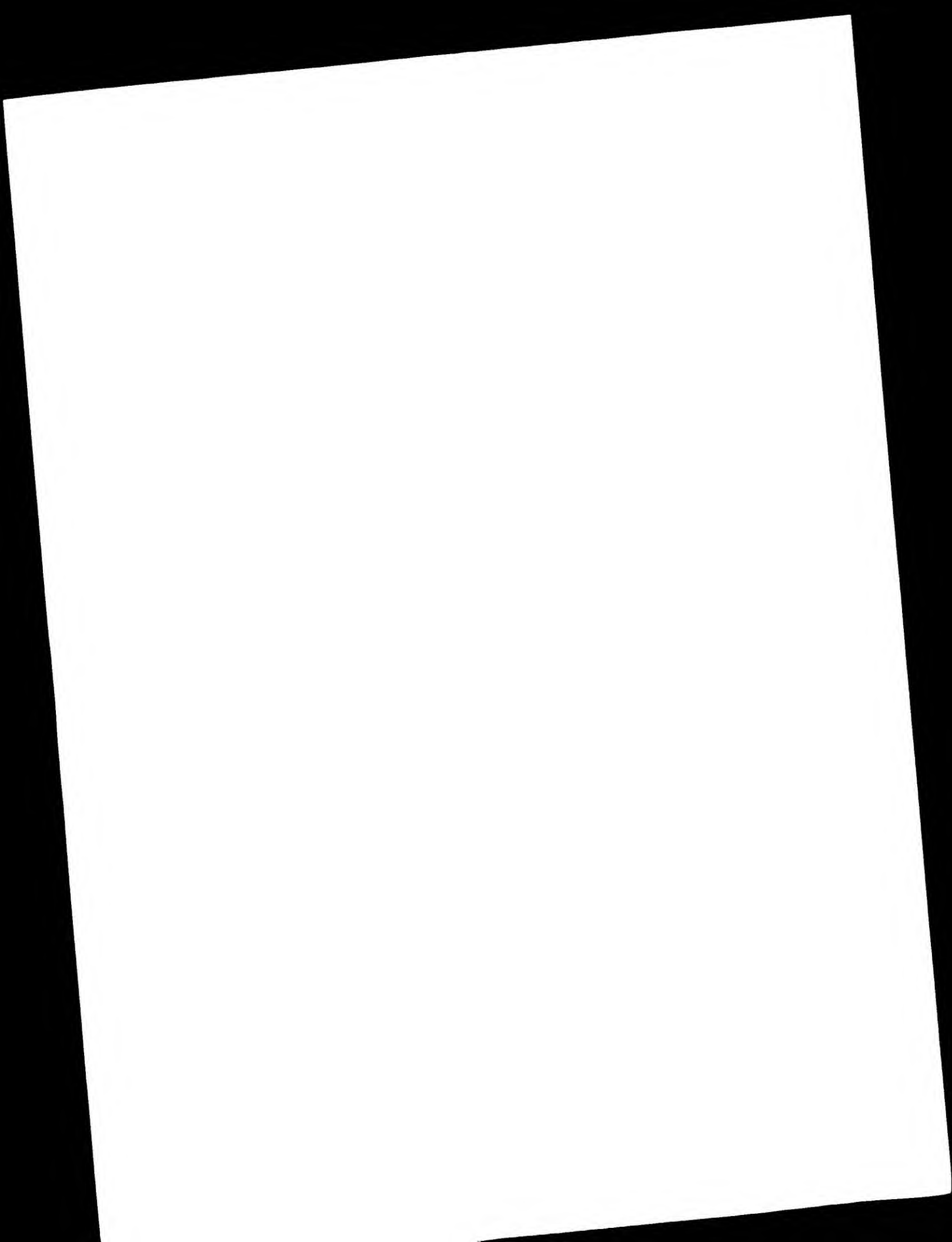
Authorized officer

Diana Nissen

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Telephone No.: (41-22) 328.88.88

BEST AVAILABLE COPY



PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<b>(51) 国際特許分類6</b> <b>C12N 15/12, C07K 14/47, 16/18, C12N</b> <b>5/10, A61K 38/17, G01N 33/50</b>	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO99/55863</b>  <b>(43) 国際公開日</b> 1999年11月4日(04.11.99)
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP99/02283  <b>(22) 国際出願日</b> 1999年4月28日(28.04.99)  <b>(30) 優先権データ</b> 特願平10/119731 1998年4月28日(28.04.98) JP  <b>(71) 出願人</b> (米国を除くすべての指定国について) 小野薬品工業株式会社 (ONO PHARMACEUTICAL CO., LTD.)[JP,JP] 〒541-8526 大阪府大阪市中央区道修町2丁目1番5号 Osaka, (JP) <b>(72) 発明者 ; および</b> <b>(75) 発明者 / 出願人</b> (米国についてののみ) 本席 佐(HONJO, Tasuku)[JP/JP] 〒606-0001 京都府京都市左京区岩倉大鷲町19-4 Kyoto, (JP) 田代 啓(TASHIRO, Kei)[JP/JP] 〒603-8162 京都府京都市北区小山東大野町93 Kyoto, (JP) 中邨智之(NAKAMURA, Tomoyuki)[JP/US] カリフォルニア州サンディエゴ5324番 パルミラドライブ7665 California, (US)		<b>(74) 代理人</b> 弁理士 大家邦久、外(OHIE, Kunihisa et al.) 〒103-0013 東京都中央区日本橋人形町2丁目2番6号 堀口第2ビル7階 大家特許事務所 Tokyo, (JP)  <b>(81) 指定国</b> JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)  <b>添付公開書類</b> 国際調査報告書
<b>(54) Title: NOVEL POLYPEPTIDE, cDNA ENCODING THE SAME AND UTILIZATION THEREOF</b>  <b>(54) 発明の名称</b> 新規なポリペプチド、そのポリペプチドをコードするcDNA、およびその用途  <b>(57) Abstract</b> A novel mouse polypeptide applicable to the treatment of diseases in which abnormal proliferation of smooth muscle participates, for example, arteriosclerosis and myoma, because of having an effect of inhibiting the proliferation of vascular smooth muscle cells. Moreover, this polypeptide has hematopoietic cell-regulatory activity, tissue generation/repair activity, activin/inhibin activity, taxis/chemotaxis activity, blood coagulation and thrombus activity, receptor/ligand activity, etc. and, therefore, is expected as useful in preventing and/or treating various diseases.		

(57)要約

マウスの新規なポリペプチド、そのポリペプチドをコードするcDNA、およびその用途に関する。

本発明のポリペプチドは、血管平滑筋細胞の増殖を抑制する効果を有するため、異常な平滑筋の増殖に係る疾患、例えば動脈硬化や筋腫等の治療に適用可能である。また、造血細胞制御活性、組織生成/修復活性、アクチビン/インヒビン活性、走化性/化学運動性活性、凝血および血栓活性、受容体/リガンド活性等を有し、種々の疾患予防および/または治療に有用であると考えられる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦  
AL アルバニア  
AM アルメニア  
AT オーストラリア  
AU オーストラリア  
AZ アゼルバイジャン  
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ  
BB バルバドス  
BE ベルギー  
BF ブルキナ・ファソ  
BG ブルガリア  
BJ ベナン  
BR ブラジル  
BY ベラルーシ  
CA カナダ  
CF 中央アフリカ  
CG コンゴ  
CH スイス  
CI コートジボアール  
CM カメルーン  
CN 中国  
CR コスタ・リカ  
CU キューバ  
CY キプロス  
CZ チェコ  
DE ドイツ  
DK デンマーク

DM ドミニカ  
EE エストニア  
ES スペイン  
FI フィンランド  
FR フランス  
GA ガボン  
GB 英国  
GD グレナダ  
GE ジョージア  
GH ガーナ  
GM ガンビア  
GN ギニア  
GW ギニア・ビサウ  
GR ギリシャ  
HR クロアチア  
HU ハンガリー  
ID インドネシア  
IE アイルランド  
IL イスラエル  
IN インド  
IS アイスランド  
IT イタリア  
JP 日本  
KE ケニア  
KG キルギスタン  
KP 北朝鮮  
KR 韓国

KZ カザフスタン  
LC セントルシア  
LI セリテンシュタイン  
LK スリランカ  
LR リベリア  
LS レソト  
LT リトアニア  
LU ルクセンブルグ  
LV ラトヴィア  
MA モロッコ  
MC モナコ  
MD モルドヴァ  
MG マダガスカル  
MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国  
ML マリ  
MN モンゴル  
MR モーリタニア  
MW マラウイ  
MX メキシコ  
NE ニジェール  
NL オランダ  
NO ノルウェー  
NZ ニュージーランド  
PL ポーランド  
PT ポルトガル  
RO ルーマニア

RU ロシア  
SD スーダン  
SE スウェーデン  
SG シンガポール  
SI スロベニア  
SK スロヴァキア  
SL シエラ・レオネ  
SN セネガル  
SZ スワジランド  
TD チャド  
TG トーゴ  
TJ タジキスタン  
TZ タンザニア  
TM トルクメニスタン  
TR トルコ  
TT トリニダード・トバゴ  
UA ウクライナ  
UG ウガンダ  
US 米国  
UZ ウズベキスタン  
VN ヴイエトナム  
YU ユーゴスラヴィア  
ZA 南アフリカ共和国  
ZW ジンバブエ



## 明細書

新規なポリペプチド、そのポリペプチドをコードする cDNA、  
およびその用途

5

## 技術分野

本発明は、新規なポリペプチド、そのポリペプチドをコードする cDNA、  
およびその用途に関する。

10

## 背景技術

現代医学の研究では、心臓血管系の疾患は死を招く原因であるので、心臓  
血管領域は大きな関心を喚起する分野である。心臓血管領域の研究は、動脈  
内膜再形成および動脈リモデリングに関する重要な事実を明らかにしており、  
双方とも動脈硬化におけるプラーク形成並びに血管狭窄に寄与すると考えら  
15 れている。例えば、動脈硬化の動物モデルでの血管損傷を与える高コレステ  
ロール血症における細胞レベルでの過程には 3 つの事象がある。動脈壁の病  
変を形成する 3 要素は、a) 平滑筋細胞、マクロファージおよびリンパ球の  
増殖、b) 結合組織の形成、c) 新たに形成された結合組織マトリックスへ  
の脂肪およびコレステロールの蓄積、である。この 3 要素の関与に関しての  
20 正確な順位付けには議論を要するが、平滑筋細胞の異常な分化、脱分化、増  
殖が構造的に血管障害に寄与することは明らかである。更に、平滑筋細胞の  
異常な増殖が関与するもう一つの重要な組織学的過程は、経皮的冠動脈形成  
術後 (Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty) の再狭窄である。

血管形成における平滑筋が構成する部分に係る分子を単離し、上記のよう  
25 な異常な平滑筋細胞の増殖を制御するために使用することを目的として、鋭  
意努力した。

従来、ある特定のポリペプチドまたはそれをコードする cDNA を得ようとする場合、組織や細胞培養液中に目的とする生物活性を確認し、次いでポリペプチドの単離精製を経て、遺伝子をクローニングするという方法、あるいはその生物活性を指標として遺伝子を発現クローニングする方法が一般的に用いられてきた。

しかし、生体内生理活性ポリペプチドは、多様な生物活性を有している場合が多いので、あるひとつの活性を指標にして遺伝子をクローニングした結果、それが既知のポリペプチドと同一であることが後になって判明するという事例が増えている。また、微量しか産生されなかったり、特別な生理的条件下でのみ発現する因子も多く、そのことが単離、精製および生物活性の確認を困難なものとしている。

近年、cDNA の作製技術やシーケンス技術は急速に発展し、大量の cDNA のシーケンスを迅速に行なうことができるようになった。そこでこれらの技術を利用して、様々な細胞や組織から cDNA ライブラリーを作製し、ランダムに cDNA をクローニングして塩基配列を決定し、新規なポリペプチドをコードする遺伝子を単離する方法が発展している。この方法は、生化学的、遺伝学的な解析を一切必要とせずに遺伝子をクローニングし、その塩基配列の情報を得ることができるという特徴を有しているが、目的とする遺伝子の発見は偶発的要素が大きい。

20

#### 発明の開示

本発明者らは、平滑筋細胞の異常増殖に係る疾患の治療、診断、あるいは研究上有益な新規な因子（ポリペプチド）、特に分泌シグナルを有する分泌蛋白質および膜蛋白質に着目してそれを見出すべく、鋭意検討を行なった。

本発明者らは、これまで造血系や免疫系で働く増殖分化因子の遺伝子のクローニングを研究してきた。そして、増殖分化因子（例えば、各種サイトカ

イン等)のような分泌蛋白質やそのレセプターのような膜蛋白質(以下、これらをまとめて分泌蛋白質等と呼ぶ。)の大部分がそのN末端にシグナルペプチドと呼ばれる配列を有していることに着目して、シグナルペプチドをコードする遺伝子を効率的かつ選択的にクローニングする方法を鋭意検討した。

- 5    その結果、動物細胞を用いて、シグナルペプチドをコードする配列を有する cDNA を簡単に選別できる方法(シグナルシーケンストラップ(SST)法)を見出した(特開平 6-315380 号参照)。

- 10    さらに同じ概念のもとに、酵母を用いてさらに効率よくかつ簡便にシグナルペプチドをコードする遺伝子を単離する方法(酵母 SST 法)も開発された(米国特許第 5,536,637 号参照)。

本方法を用いて、マウス胎児心臓組織が産生している新規な分泌蛋白質、およびそれをコードする cDNA を同定することに成功し、全長 cDNA をその情報を基にマウス胎児心臓組織より見出し、更に該ポリペプチドが血管平滑筋細胞の増殖を抑制する効果を有することを確認し、本発明を完成した。

- 15    本発明が提供する cDNA 配列は、マウス A55 クローンと命名され、マウス胎児心臓組織から作製した cDNA ライブラリーより、上記酵母 SST 法を使用して得た情報をもとに単離された。マウス A55 クローンは分泌蛋白質(ここではマウス A55 蛋白として表わされる)をコードする完全な cDNA 配列を含む全長鎖 cDNA である。

- 20    核酸配列データベースに登録されている既知の核酸配列に対して BLASTN および FASTA により、またアミノ酸配列データベースに登録されている既知のポリペプチドのアミノ酸配列に対して BLASTX、BLASTP および FASTA により検索した結果、本発明のポリペプチド、マウス A55 およびそれらをコードする核酸配列と一致する配列はなかった。このことから、本発明のポリ  
25    ペプチドは、新規の分泌蛋白質であることが判明した。

また、本発明者らは、前記ポリペプチドが血管平滑筋細胞の増殖を抑制す

る効果を有することを確認した。そのため、該ポリペプチドは異常な平滑筋の増殖に係る疾患、例えば動脈硬化や経皮的冠動脈形成術（PTCA）後の再狭窄をもたらす血管内膜肥厚、筋腫等の治療に有用であると考えられる。

本発明は、

- 5 (1) 配列番号 1、4、6 または 9 で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、
- (2) 前記 (1) に記載したポリペプチドをコードする cDNA、
- (3) 配列番号 2、5、7 または 10 で示される塩基配列からなる cDNA、
- (4) 配列番号 3 または 8 で示される塩基配列からなる cDNA、
- 10 に関する。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、PDGF 刺激によるラット大動脈血管平滑筋細胞の増殖に対し、マウス A55 蛋白が阻害する様子を表わす。

15

#### 詳細な説明

本発明は、実質的に純粋な形である配列番号 1、4、6 または 9 で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、そのホモログ、その配列のフラグメントおよびそのホモログに関する。

- 20 本発明はさらにそれらのポリペプチドをコードする cDNA に関する。より具体的には、配列番号 2、5、7 または 10 で示される塩基配列からなる cDNA、および配列番号 2、5、7 または 10 で示される塩基配列に選択的にハイブリダイズするフラグメントを有する cDNA に関する。ハイブリダイズする cDNA には、上記配列の相補配列も含まれる。ハイブリダイズ
- 25 は、ストリンジェントな条件で行なわれることが好ましい。

実質的に純粋な形である配列番号 1、4、6 または 9 で示されるアミノ酸

配列からなるポリペプチドとは、一般に、生産時のポリペプチドの90%以上、例えば、95、98または99%が配列番号1、4、6または9で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドであることを意味する。

5 配列番号1、4、6または9で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのホモログとは、一般に少なくとも20個、好ましくは少なくとも30個、例えば40、60または100個の連続したアミノ酸領域で、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80または90%、より好ましくは95%以上相同性であるものであり、そのようなホモログは、以後本発明のポリペプチドとして記載される。

10 さらに、配列番号1、4、6または9で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのフラグメント、またはそれらのホモログのフラグメントとは、少なくとも10アミノ酸、好ましくは少なくとも15アミノ酸、例えば20、25、30、40、50または60アミノ酸部分を意味する。

15 配列番号2、5、7または10で示される塩基配列からなるcDNAに選択的にハイブリダイズするcDNAとは、一般に、少なくとも20個、好ましくは少なくとも30個、例えば40、60または100個の連続した塩基配列領域で、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80または90%、より好ましくは95%以上相同性であるものであり、そのようなcDNAは、以後本発明のcDNAとして記載される。

20 配列番号2、5、7または10で示される塩基配列からなるcDNAのフラグメントとは、少なくとも10塩基、好ましくは少なくとも15塩基、例えば20、25、30または40塩基部分を意味し、そのようなフラグメントも本発明のcDNAに含まれる。

25 さらに、本発明には、本発明のcDNAからなる複製または発現ベクターが含まれる。ベクターとしては、例えば、ori領域と、必要により上記cDNAの発現のためのプロモーター、プロモーターの制御因子などからなる

プラスミド、ウィルスまたはファージベクターが挙げられる。ベクターはひとつまたはそれ以上の選択的マーカー遺伝子、例えばアンピシリン耐性遺伝子を含んでいてもよい。ベクターは、イン・ビトロ (in vitro) において、例えば cDNA に対応する RNA の製造、宿主細胞の形質転換に用いることが

5 できる。

さらに、本発明には、配列番号 2、3、5、7、8 または 10 で示される塩基配列、またはそれらのオープンリーディングフレームからなる cDNA を含む本発明の cDNA を複製または発現させるためのベクターで形質転換された宿主細胞も含まれる。細胞としては、例えば細菌、酵母、昆虫細胞ま

10 たは哺乳動物細胞が挙げられる。

さらに、本発明には、本発明のポリペプチドを発現させるための条件下で、本発明の宿主細胞を培養することからなる本発明のポリペプチドの製造方法も含まれる。培養は、本発明のポリペプチドが発現し、宿主細胞より製造される条件下で行われることが好ましい。

15 本発明の cDNA は、上記のようなベクターのアンチセンス領域に挿入することでアンチセンス RNA を製造することもできる。このようなアンチセンス RNA は、細胞中の本発明のポリペプチドのレベルを制御することに用いることもできる。

本発明は、本発明におけるポリペプチドのモノクローナルまたはポリクローナル抗体も含む。さらに本発明におけるポリペプチドのモノクローナルまたはポリクローナル抗体の製造方法も含む。モノクローナル抗体は、本発明のペプチドまたは、その断片を抗原として用い、通常のハイブリドーマの技術により製造することができる。ポリクローナル抗体は、宿主動物（例えば、ラットやウサギ等）に本発明のポリペプチドを接種し、免疫血清を回収する

25 通常の方法により製造することができる。

本発明には、本発明のポリペプチド、その抗体と薬学的に許容される賦形

剤および／または担体を含有する薬学的組成物も含まれる。

(1) の本発明のポリペプチドとしては、配列番号 1、4、6 または 9 で示されたアミノ酸配列からなるもの以外に、その一部が欠損したもの（例えば、配列番号 1 中、生物活性の発現に必須な部分だけからなるポリペプチド等）、その一部が他のアミノ酸と置換したもの（例えば、物性の類似したアミノ酸に置換したもの）、および上記本発明のポリペプチドに他のアミノ酸が付加または挿入されたものも含まれる。

よく知られているように、ひとつのアミノ酸をコードするコドンには 1 ～ 6 種類（例えば、Met は 1 種類、Leu は 6 種類）知られている。従って、ポリペプチドのアミノ酸配列を変えることなく cDNA の塩基配列を変えることができる。

(2) で特定される本発明の cDNA には、(1) の配列番号 1、4、6 または 9 で示されるポリペプチドをコードするすべての塩基配列群が含まれる。塩基配列を変えることによって、ポリペプチドの生産性が向上することがある。

(3) で特定される cDNA は、(2) で示される cDNA の一態様であり、天然型配列を表わす。

(4) に示される cDNA は、(3) で特定される cDNA に天然の非翻訳部分を加えた配列を示す。

配列番号 3 または 8 で示される塩基配列からなる cDNA の作製は、以下の方法に従って行われる。

はじめに酵母 SST 法（米国特許第 5,536,637 号に記載）の概要について説明する。

サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) などの酵母がショ糖またはラフィノースをエネルギー源や炭素源として利用するためにはインベルターゼを培地中に分泌しなければならない（インベルターゼはラフィノ

ースをショ糖とメリビオースに、ショ糖をフルクトースとグルコースに分解する酵素である。)。また数多くの既知の哺乳類のシグナルペプチドは酵母のインベルターゼを分泌させうることが知られている。

- 5 ナルペプチドを哺乳類のcDNAライブラリーからラフィノース培地上での酵母の生育を指標にスクリーニングする方法として本方法は開発された。

翻訳開始点ATGを削除した非分泌型のインベルターゼ遺伝子SUC2 (GENBANK accession No.V01311) を酵母の発現ベクターに組み込んで酵母SST用ベクターpSUC2を作製した。

- 10 発現ベクターには、AAH5プラスミド (Gammerer, Methods in Enzymol. 101,192-201,1983) 由来の発現用プロモーター (ADHプロモーター) およびターミネーター (ADHターミネーター) が組み込まれ、酵母複製起点としては2 $\mu$  ori、酵母選択マーカーにはTRP1、大腸菌複製起点としてはColE1 ori、大腸菌薬剤耐性マーカーにはアンピシリン耐性遺伝子が
- 15 それぞれ組み込まれている。

- そのSUC2遺伝子上流に哺乳類のcDNAを組み込んで、酵母SST cDNAライブラリーを調製した。このライブラリーを分泌型インベルターゼを欠損している酵母に形質転換した。組み込まれた哺乳類cDNAがシグナルペプチドをコードしている場合、酵母で発現されたインベルターゼに対
- 20 しても分泌作用をもつと考えられ、その結果ラフィノース培地上での生育が可能となる。

よって出現したコロニーから酵母を培養してプラスミドを調製し、インサートcDNAの塩基配列を決定することによって、新規シグナルペプチドの検索を迅速かつ容易にした。

- 25 酵母SST cDNAライブラリーの作製は
- (1) 対象となる細胞よりmRNAを単離し、特定の制限酵素 (酵素I)



サイトを連結したランダムプライマーを用いて二本鎖 cDNA を合成し、

(2) 酵素 I とは異なる特定の制限酵素 (酵素 II) サイトを含むアダプターを連結して、酵素 I で消化した後、適当なサイズで分画し、

(3) 酵母発現ベクター内のシグナルペプチドを削除したインベルターゼ  
5 遺伝子上流に得られた cDNA 断片を連結し、形質転換する工程よりなる。

各工程を詳しく説明すると、工程 (1) では、対象となる哺乳類の臓器や細胞株などより、必要により適当な刺激剤で刺激した後、公知の方法 (以下、公知の方法は特に記載がなければ Molecular Cloning (Sambrook, J., Fritsch, E. F. および Maniatis, T. 著、Cold Spring Harbor Laboratory Press より 1989 年に発刊)  
10 または Current Protocol in Molecular Biology (F. M. Ausubel ら編、John Wiley & Sons, Inc. より発刊) に記載の方法に従って行われる。) に従って mRNA の単離が行われる。

対象となる組織としては、マウス胎児心臓が挙げられる。ランダムプライマーを用いる二本鎖 cDNA の合成は公知の方法により行われる。

15 アダプターに連結される制限酵素 (酵素 I) サイトと次の工程 (2) で用いられる制限酵素 (酵素 II) サイトは、互いに異なるものであれば何を用いてもよい。好ましくは、酵素 I として Xho I、酵素 II としては EcoRI が用いられる。

工程 (2) では T4 DNA ポリメラーゼで末端を平滑化し、酵素 II アダプターを連結した後、酵素 I で消化し、アガロース電気泳動 (AGE) により  
20 300 ~ 800 bp の cDNA を分画する。酵素 II は、前記したように酵素 I と異なるものなら何でもよい。

工程 (3) は、酵母発現用プラスミドベクターに連結されたシグナルペプチドを削除したインベルターゼの遺伝子上流に (2) で得られた cDNA  
25 断片を組み込んで大腸菌に形質転換する工程である。ここで酵母発現用プラスミドベクターとしては種々のものが知られているが、例えば、大腸菌内で

も機能する Y E p 2 4 などが用いられるが、好適には前述したプラスミド p S U C 2 が用いられる。

形質転換のための宿主大腸菌株はすでに多くのものが知られており、好ましくは D H 1 0 B のコンピテントセルである。また形質転換方法は公知の方法のいずれを用いてもよいが、好ましくはエレクトロポレーション法により  
5 行われる。形質転換体は公知の方法により培養され、酵母 S S T 用の c D N A ライブラリーが得られる。

この c D N A ライブラリーでは、すべてのクローンに c D N A 断片が導入されている訳ではないし、またすべてが未知のシグナルペプチドをコードする遺伝子断片とは限らない。そこで、次に該ライブラリーから未知のシグナルペプチドをコードする遺伝子断片をスクリーニングする必要がある。  
10

そのためには、c D N A ライブラリーをインペルターゼ遺伝子をもたない酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (例えば Y T 4 5 5 株など) またはインペルターゼ遺伝子を入為的に欠損させた株 (公知の方法に従い作製可能) に、該 c D N A ライブラリーを導入し、シグナルペプチドをコードする配列を有する断片のスクリーニングを行なう。  
15

酵母の形質転換は公知の方法、例えば酢酸リチウム法によって行われる。形質転換体を選択培地で生育後、ラフィノースを炭素源とする培地に移し、生育可能なコロニーを選択し、プラスミドを回収する。ラフィノースを炭素源として酵母が生育したということは、ライブラリー中に何らかの分泌蛋白質のシグナルペプチドが組み込まれていたことを示している。  
20

次に、単離した陽性クローンについて、塩基配列を決定し、未知の蛋白質をコードすることが明らかになった c D N A については、それをプローブとして全長クローンを単離し、全長の塩基配列を決定することができる。これらの操作は、当業者にとってすべて公知の方法で行われる。  
25

配列番号 2、5、7 または 1 0 で示される塩基配列が、一部、好ましくは

全てが確定されると哺乳類に存在する本発明の蛋白質をコードする cDNA  
もしくは本発明蛋白質のホモログおよびサブセットをコードする cDNA  
を得ることができる。

- 5 適当な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを合成し、それを用いて、哺乳類由来の cDNA ライブラリーあるいは mRNA から PCR 法により、あるいは適当な塩基配列の断片をプローブとしてハイブリダイズさせることにより、他の哺乳類 cDNA ライブラリーあるいは該ゲノムライブラリーから、他の哺乳類型の当該蛋白質をコードする cDNA を得ることができる。

- 10 このようにして得られた cDNA が、SST で得られた cDNA 断片の塩基配列（またはその相同配列）を含んでいるならばシグナルペプチドをコードしていることになるので、該 cDNA が全長、またはほぼ全長であることは明らかである（シグナルペプチドは例外なく蛋白質の N 末端に存在することから、cDNA のオープンリーディングフレームの 5' 末端にコードされている。）。

- 15 さらに公知の方法に従い、該 cDNA をプローブとしてノザン（Northern）解析によって全長の確認をしてもよい。ハイブリダイズしたバンドから得られる mRNA のサイズと該 cDNA のサイズを比較し、ほぼ同じであれば該 cDNA はほぼ全長であると考えられる。

- 20 本発明は、開示された蛋白の全長型並びに成熟型の両方を提供する。それらの蛋白の全長型は、配列番号 2 または 7 で示される塩基配列の翻訳されるアミノ酸配列で同定される。それらの成熟蛋白は、配列番号 3 または 8 で示される全長 DNA を適当な哺乳類の細胞あるいはその他の宿主細胞で発現させることによって得られる。成熟型の蛋白の配列は、全長型のアミノ酸配列より予測可能である。

- 25 配列番号 2、5、7 または 10 で示される塩基配列が一旦確定されると、その後は、化学合成によって、あるいは該塩基配列の断片を化学合成し、こ

れをプローブとしてハイブリダイズさせることにより、本発明のcDNAを得ることができる。

さらに、本cDNAを含有するベクターcDNAを適当な宿主に導入し、これを増殖させることによって、目的とするcDNAを必要量得ることがで

5 きる。

本発明のポリペプチドを取得する方法としては、

- (1) 生体または培養細胞から精製単離する方法、
- (2) ペプチド合成する方法、または
- (3) 遺伝子組み換え技術を用いて生産する方法、

10 などが挙げられるが、工業的には(3)に記載した方法が好ましい。

遺伝子組み換え技術を用いてポリペプチドを生産するための発現系(宿主-ベクター系)としては、例えば、細菌、酵母、昆虫細胞および哺乳動物細胞の発現系が挙げられる。

例えば、大腸菌で発現させる場合には、成熟蛋白部分をコードするcDNAの5'末端に開始コドン(ATG)を付加し、得られたcDNAを、適当なプロモーター(例えば、trpプロモーター、lacプロモーター、 $\lambda$ PLプロモーター、T7プロモーター等)の下流に接続し、大腸菌内で機能するベクター(例えば、pBR322、pUC18、pUC19等)に挿入して発現ベクターを作製する。

20 次に、この発現ベクターで形質転換した大腸菌(例えば、E. Coli DH1、E. Coli JM109、E. Coli HB101株等)を適当な培地で培養して、その菌体より目的とするポリペプチドを得ることができる。また、バクテリアのシグナルペプチド(例えば、pelBのシグナルペプチド)を利用すれば、ペリプラズム中に目的とするポリペプチドを分泌することもできる。さらに、  
25 他のポリペプチドとのフュージョン・プロテイン(fusion protein)を生産することもできる。

また、哺乳動物細胞で発現させる場合には、例えば、配列番号 2、5、7  
または 10 で示される塩基配列を適当なベクター（例えば、レトロウイルス  
ベクター、パピローマウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、S  
V 40 系ベクター等）中の適当なプロモーター（例えば、S V 40 プロモ  
5 ター、L T R プロモーター、メタロチオネインプロモーター等）の下流に挿  
入して発現ベクターを作製する。次に、得られた発現ベクターで適当な哺乳  
動物細胞（例えば、サル C O S - 1 細胞、C O S - 7 細胞、チャイニーズハ  
ムスター C H O 細胞、マウス L 細胞等）を形質転換し、形質転換体を適当な  
培地で培養することによって、分泌蛋白である本発明の蛋白は、その細胞上  
10 清中に目的とするポリペプチドとして発現される。さらに、その他のポリペ  
プチド、例えば抗体の定常領域（F c portion）をコードする c D N A 断片と  
連結することによって、フュージョン・プロテイン（fusion protein）を生産す  
ることもできる。以上のようにして得られたポリペプチドは、一般的な生化学  
的方法によって単離精製することができる。

15

#### 産業上の利用可能性

本発明のポリペプチドおよびそれをコードする c D N A は、一つあるいは  
それ以上の効果あるいは生物活性（以下に列挙するアッセイに関連するもの  
を含む）を示すことが考えられる。

20 本発明の蛋白に関して記述される効果あるいは生物活性は、その蛋白の投  
与あるいは使用により、あるいは、その蛋白をコードする c D N A の投与あ  
るいは使用（例えば、遺伝子療法や c D N A 導入に適したベクター）により  
提供される。また、本発明者らは、本発明のポリペプチドが血管平滑筋細胞  
の増殖を抑制する効果を有することを確認した。そのため、本発明のポリペ  
25 プチドを用いて平滑筋の異常な増殖が関係する疾患、例えば動脈硬化や経皮  
的冠動脈形成術（P T C A）後の再狭窄をもたらす血管内膜肥厚、筋腫等の

治療に応用可能であると考えられる。

本発明はこれに限定されるものではないが、以下の活性を示す可能性がある。

[サイトカイン活性および細胞増殖／分化活性]

- 5 本発明の蛋白は、サイトカイン活性および細胞増殖（誘導あるいは阻害）／分化活性（誘導あるいは阻害）を示す可能性、あるいはある細胞集団に他のサイトカインの産生を誘導あるいは抑制すると考えられる。

- 10 全ての既知のサイトカインを含む、現在発見されている多くの蛋白性因子は、因子に依存した一つあるいはそれ以上の細胞増殖アッセイ法で、活性を示してきたので、それらのアッセイは、サイトカイン活性の便利な確認法として機能する。本発明の蛋白の活性は、多くの従来の因子依存性の細胞株の細胞増殖アッセイのうちのいずれかによって証明され得る。

[免疫刺激／抑制活性]

- 本発明の蛋白は、免疫刺激活性および免疫抑制活性も示すと考えられる。
- 15 また、ある蛋白は、例えば、Tリンパ球およびBリンパ球あるいはどちらか一方の成長および増殖を制御（刺激あるいは抑制）することや、同様にNK細胞や他の集団の細胞傷害性活性に影響を与えることによって、様々な免疫不全および疾患（severe combined immunodeficiency（SCID）を含む）の治療に効果を示すと考えられる。

- 20 これらの免疫不全は遺伝性である場合もあるし、例えばHIVのようなウイルスや、同様に細菌やカビの感染が原因で起こる場合もある。あるいは、自己免疫疾患に由来する可能性もある。

- より具体的には、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、肝炎ウイルス（hepatitis viruses）、ヘルペスウイルス（herpes viruses）、ミコバクテリア（mycobacteria）、
- 25 リーシュマニア（leishmania）、マラリア（malaria）およびカンジダ（candida）のような様々なカビ感染を含む、ウイルス、細菌、カビあるいは他の感染に

よる感染症の原因を、本発明の蛋白を用いることによって治療できると考えられる。もちろん、この関連より、本発明の蛋白は、免疫システムが増大していることが一般的に示唆される場所、すなわち癌治療の箇所において効果を示すと考えられる。

- 5      本発明の蛋白は、アレルギー反応および喘息や他の呼吸器系疾患のような状況の治療に効果にも効果を示すと考えられる。免疫抑制が望まれるような他の状態（例えば、喘息や関連呼吸器疾患を含む）にも、本発明の蛋白を用いて治療できると考えられる。

- 10      本発明の蛋白は、例えば、敗血病性のショックあるいは全身性炎症反応症候群（S I R S）のような感染、炎症性大腸炎、クローン病、あるいはI L - 1 1により効果が証明されたT N FやI L - 1のようなサイトカインの過剰産生から由来するような感染に関連した慢性あるいは急性の炎症を抑制する可能性もある。

〔造血細胞制御活性〕

- 15      本発明の蛋白は、造血細胞の制御に、またそれに応じて骨髓球様細胞あるいはリンパ球様細胞の欠乏に対する治療にも効果を示すと考えられる。コロニー形成細胞あるいは因子依存性細胞株の援助の下での極く弱い生物活性でさえも、造血細胞の制御に係わることを示唆する。その生物活性とは、次に挙げる例の全てあるいはそのいずれかで例えられるようなものに係わるものである。
- 20      赤血球前駆細胞のみの成長および増殖を支持、あるいは他のサイトカインとの組み合わせ、また、それが示唆する有効性、例えば様々な貧血の治療、あるいは赤血球前駆細胞および赤血球あるいはそのどちらかの産生を刺激する放射線療法／化学療法と組み合わせた使用；
- 25      顆粒球および単球／マクロファージのような骨髓球の成長および増殖を支持（すなわち、古典的なC S F活性）、化学療法に伴う骨髓抑制を防ぐための化学療法との併用；

巨核球の成長および増殖およびそれに続く血小板の成長および増殖の支持、それによって血小板減少症のような様々な血小板障害を防御および治療を可能とする血小板輸血の際あるいは相補的に一般的使用；

- 上記造血細胞の幾つかあるいは全ての細胞へ成熟可能な造血幹細胞の成長および増殖の支持、従って、様々な幹細胞障害（限定はされないが、再生不良性貧血および発作性夜間血色素尿症を含む、移植で一般的に治療されるようなもの）に治療的効果を見い出せる、また、正常細胞あるいは遺伝子療法のため遺伝的に操作された細胞をインビトロ（in-vitro）あるいはエクソビオ（ex-vivo）（すなわち、骨髄移植に伴う）どちらかで、放射線療法／化学療法後の幹細胞分画の再構築を行なうことも同様である。

種々の造血幹細胞株の増殖と分化に対する適切なアッセイは、上記に記載されている。

本発明の蛋白は、他の方法の中で、以下の方法により測定することが可能である。

15    [組織生成／修復活性]

本発明の蛋白は、損傷治癒および組織修復、また、火傷、切開、および潰瘍の治療と同様に、骨、軟骨、腱、靱帯、および神経組織成長あるいは再生のいずれかに使用されると考えられる。

- 骨を正常に形成しない環境での軟骨および骨あるいはいずれかの成長を誘導するような本発明の蛋白は、ヒトおよび他の動物の骨折および軟骨損傷あるいは欠損の治癒に適用される。該発明の蛋白を使用している製剤は、開放骨折と同様に閉鎖骨折の整復、また人工関節の固定の改良にも、予防的使用できると考えられる。

- 骨形成剤により誘導された新生骨形成は、先天性、外傷性、癌切除術により誘発した頭蓋顔面の欠損の修復に貢献する。また、美容形成外科分野にも有効である。



本発明の蛋白は、歯根膜症の治療および他の歯の修復にも使用されることがえられる。そのような薬品は、骨形成細胞を引き寄せ、その細胞の増殖を刺激し、その前駆細胞の分化を誘導する環境を提供すると考えられる。

5 本発明の蛋白は、骨および軟骨あるいはいずれかの修復を刺激することを通して、あるいは、炎症あるいは炎症過程で介される組織破壊（コラゲナーゼ活性や破骨細胞の活性）の過程を阻止することにより、骨粗鬆症および骨関節炎の治療に有効であると考えられる。

10 本発明の蛋白に起因すると考えられる組織再生活性の別のカテゴリーは腱／靱帯形成である。本発明の蛋白は、腱／靱帯様組織あるいは他の組織が正常に形成されない環境でそのような組織形成を誘導するものであるが、ヒトおよび他の動物における腱／靱帯の裂傷、奇形、および他の腱／靱帯の障害の治癒に適用できる。

15 腱／靱帯様組織を誘導する蛋白を使用している製剤は、骨あるいは他の組織への腱／靱帯の固定の改良、および腱／靱帯組織の欠損の修復での使用はもちろん、腱あるいは靱帯の損傷の防御に対して予防的使用も考えられる。

本発明の構成物により誘導された新生腱／靱帯様組織形成は、先天性、外傷、あるいは他の起源の腱あるいは靱帯欠損の修復に貢献する。また、腱あるいは靱帯の貼付あるいは修復という美容形成外科でも有効である。

20 本発明の構成物は、腱／靱帯形成細胞を引き寄せ、その細胞の増殖を刺激し、その前駆細胞の分化を誘導する環境を提供すると考えられる。あるいは、組織修復を果たすため、インビボ (in vivo) への返還に備えて エクソビボ (ex vivo) で腱／靱帯細胞あるいはその前駆細胞を誘導する。

25 本発明の構成物は、腱炎、カーパルタネルシンドローム (Carpal tunnel syndrome)、および他の腱あるいは靱帯欠損の治療にも有効である。該構成物には、適当なマトリックスおよびキャリアーと同様に当業者に良く知られているセクエスティング (Sequestering) 剤も含まれる。

本発明の蛋白は、神経細胞の増殖、および、神経および脳組織の再生、即ち、神経細胞あるいは神経組織の変性、死、あるいは外傷を含む機械的および外傷的障害と同様に中枢および末梢神経系疾患および神経病の治療に対しても、効果を示すと考えられる。

- 5 より具体的には、ある蛋白は、末梢神経障害、末梢神経症、および局所的神経症のような末梢神経系の疾患、およびアルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、およびシャイードラガー（Shy-Drager）症候群のような中枢神経系の疾患の治療に有効であると考えられる。

- 10 更に本発明に応じて治療され得る条件には、脊髄障害、頭部外傷、および脳卒中等の脳血管疾患のような機械的および外傷的障害を含む。化学療法あるいは他の治療から起因する末梢神経症も本発明の蛋白を用いて治療可能である。

- 15 本発明の蛋白は、例えば脾臓、肝臓、腸、腎臓、皮膚、内皮を含む臓器、平滑、骨格あるいは心臓筋肉、および血管内皮を含む血管組織のような他の組織を生成する活性、あるいはそのような組織を構成する細胞の増殖を促進または抑制する活性を示す可能性も期待される。望まれる効果の一部は、正常組織を再生させる繊維性瘢痕の阻害によっても担われると考えられる。

- 20 本発明の蛋白は、消化管保護あるいは再生、および肺あるいは肝臓の繊維化、様々な組織の再還流損傷、および全身性サイトカイン障害に起因する状態に対する治療にも有効であると考えられる。

#### [アクチビン／インヒビン活性]

- 25 本発明の蛋白は、アクチビン／インヒビンに関連した活性を示すと考えられる。アクチビンは濾胞刺激ホルモン（FSH）の放出を刺激する活性によって特徴づけられるが、インヒビンは、濾胞刺激ホルモン（FSH）の放出を阻害する活性によって特徴づけられる。よって、本発明の蛋白は、単独あるいはインヒビン $\alpha$ ファミリーのメンバーとのヘテロダイマーで、哺乳類動

物の雌の受精率を減少させ、雄の精子形成を減少させるインヒビンの活性に基づく避妊調節剤として有効であると考えられる。充分量の他のインヒビンの投与によって、哺乳動物の不妊を誘導可能である。

一方、本発明の蛋白は、インヒビン $\beta$ グループの他の蛋白サブユニットとのホモダイマーあるいはヘテロダイマーで、前脳下垂体の細胞から濾胞刺激ホルモン（FSH）放出を刺激するアクチビン分子の活性に基づいた治療的な不妊誘導として有効であると考えられる（米国特許第 4,798,885 号を参照）。本発明の蛋白は、牛、羊、および豚のような家畜の生涯出産能力可能な期間を延ばすために、性的に未熟なほ乳類動物における妊娠開始を早めることに有効であると考えられる。

〔走化性／化学運動性活性〕

本発明の蛋白は、例えば、単球、好中球、T細胞、マスト細胞、好酸球、および内皮細胞、あるいはそのいずれかを含む、哺乳動物の細胞に対して（例えば、ケモカインとして働く）走化性／化学運動性活性を有すると考えられる。

走化性／化学運動性蛋白は、反応の望まれる部位へ、望まれる細胞集団を固定化あるいは引き寄せるため使用することが可能である。走化性／化学運動性蛋白は、局所的な感染と同様に、創傷および他の外傷の治療に特別な優位性を提供する。例えば、リンパ球、単球、あるいは好中球を腫瘍あるいは感染部位へ引き寄せることは、腫瘍あるいは感染部位に対する免疫応答を改善する結果となると考えられる。

蛋白やペプチドは、もしそれが直接あるいは間接に特殊な細胞集団に対して指示された方向あるいは運動を刺激可能であれば、そのような細胞集団に対する走化性活性を保持している。望ましくは、その蛋白やペプチドは、細胞の指示された運動を直接的に刺激する活性を保持する。

特別な蛋白がある集団の細胞に対し走化性活性を保持するか否かは、どん

な既知の細胞走化性のアッセイ法にそのような蛋白あるいはペプチドを使用しても容易に決定できる。

〔凝血および血栓活性〕

- 本発明の蛋白は、凝血あるいは血栓活性も示すと考えられる。結果として、
- 5 そのような蛋白は、様々な凝固障害（血友病のような遺伝性障害を含む）の治療に有効であると予期される。あるいは、外傷、手術あるいは他の原因により生じた創傷の治療における凝固および他の凝血事象を促進させることが予期される。本発明の蛋白は、血栓の形成の溶解あるいは阻害、および血栓あるいは卒中等により生じる状態の治療および予防にも効果があると考えら
- 10 れる。

〔受容体／リガンド活性〕

- 本発明の蛋白は、受容体、受容体／リガンドあるいは受容体／リガンドのインヒビターあるいはアゴニストとしての活性を示す可能性もある。そのような受容体およびリガンドの例として、サイトカイン受容体およびそのリガ
- 15 ンド、受容体キナーゼおよびそのリガンド、受容体フォスファターゼおよびそのリガンド、細胞間相互作用に関連した受容体（セレクトイン（Selectin）、インテグリン（Integrin）、およびそのリガンド、受容体キナーゼを含む細胞接着分子等）およびそのリガンド、および抗原提示、抗原認識、および細胞性および液性免疫反応の発達に係わる受容体／リガンドの組み合わせが挙げ
- 20 られるが、本発明を制限するものではない。

- 受容体およびリガンドは、その相互作用に対する可能なペプチドあるいは小分子のインヒビターのスクリーニングにも有効である。本発明の蛋白（受容体およびリガンドの断片を含むが、制限されるものではない）は、それ自身受容体／リガンドの相互作用のインヒビターとして有効であると考えられ
- 25 る。

〔栄養剤としての利用〕

本発明の蛋白は栄養源または栄養補給剤としても使用できる。このような使用には、制限はされないが、蛋白、アミノ酸の補給、炭素源、窒素源としての使用、炭水化物源としての使用が含まれる。そのような場合において、  
5 本発明の蛋白は各生物の食物に添加できるし、また粉末や錠剤、溶液、懸濁液、カプセルなどの剤型のように、分離した個体または液体の状態で服用できる。微生物の場合、本発明の蛋白を培養液中に添加することもできる。

[カドヘリン／腫瘍転移抑制活性]

カドヘリンはカルシウム依存性接着分子であり、個体発生において特に特異的に細胞種を認識する際に主要な役割を果たすことが明らかとなっている。  
10 通常のカドヘリンの発現の欠失または変化により、腫瘍の増殖または転移につながる細胞接着性の変化が起こりうる。カドヘリンの機能不全はまた尋常性天疱瘡や落葉性天疱瘡（自己免疫発斑皮膚病）、クローン病、いくつかの発生異常のようなヒトの別の疾病にも関連している。

カドヘリンスーパーファミリーのメンバーは40を越え、個々に異なる発  
15 現パターンを示す。カドヘリンスーパーファミリーのすべてのメンバーは共通の保存された細胞外リピート（カドヘリンドメイン）を有するが、分子の別の部位においては構造上の差異が認められる。

カドヘリンドメインはカルシウムと結合しカドヘリン間で4次構造を形成するのでカルシウムは接着に必須である。最初のカドヘリンドメインの数個  
20 のアミノ酸のみがホモフィリックな接着に必須である。

この認識部位の修飾によりカドヘリンの特異性を変えることが可能であるので、変異分子はそれ自身だけを認識するのではなく、異なるカドヘリンとも結合可能となる。またいくつかのカドヘリンは異なるカドヘリンとヘテロフィリックな接着をする。

25 E-カドヘリンはカドヘリンスーパーファミリーのメンバーのひとつで上皮細胞系で発現している。もしE-カドヘリンの発現が腫瘍でみられない場

- 合、病理学的には悪性細胞が浸潤し、癌が転移する。癌細胞株にE-カドヘリンの遺伝子をトランスフェクトした場合、細胞の形が通常に戻り、細胞間や基質への接着性が保たれ、細胞増殖速度が遅くなり、足場非依存的な細胞増殖が劇的に減少することにより、癌にともなう変化が元に戻る。このよう
- 5 に導入したE-カドヘリンの発現により癌の進行が低いステージに戻る。また別のカドヘリンは別の組織由来の癌において同じ浸潤抑制の機能をもつと考えられる。そこでカドヘリン活性を有する本発明の蛋白とそれをコードする本発明の遺伝子は癌の治療に用いることができる。このような蛋白または遺伝子を癌細胞に導入することは、通常のカドヘリンの発現を供給すること
- 10 により、癌細胞においてみられる変化を減少または排除することができる。

- 癌細胞はまた異なる組織のカドヘリンの発現を示すことがある。その結果このような細胞は体内の異なる組織に浸潤、転移することができるようになる。このような細胞において、カドヘリン活性を有する本発明の蛋白とそれをコードする本発明の遺伝子は異所発現したカドヘリンに置換されうる。そ
- 15 の結果、通常細胞の接着性を保ち、転移性を減少または排除する。

- またカドヘリン活性を有する本発明の蛋白とそれをコードする本発明の遺伝子はカドヘリンを認識し結合する抗体の産生に利用できる。このような抗体は癌細胞に異所発現したカドヘリンの結合をブロックすることに使用でき、癌の形成を妨げる。このような抗カドヘリン抗体はまた癌のグレード、病理
- 20 学的タイプ、予後に対するマーカーとして使用できる。すなわち、より癌が進行していればカドヘリンの発現はより低いであろうし、カドヘリン発現の減少はカドヘリンに結合する抗体を用いることにより検出することができる。

- またカドヘリン活性を有する本発明の蛋白の断片、好ましくはカドヘリン認識部位の10個のペプチド、およびこのような本発明の蛋白断片をコード
- 25 する遺伝子はカドヘリンと結合し、好ましくない効果をもたらすカドヘリンの結合を妨げることにより、カドヘリンの機能をブロックすることにも使用

できる。さらにカドヘリン活性を有する本発明の蛋白の断片、好ましくは癌患者で安定して循環しているトランケートした可溶化カドヘリン断片、およびそのような本発明の蛋白断片をコードする遺伝子は固有の細胞間の接着を阻害することに使用できる。

5     〔腫瘍抑制活性〕

上記の免疫学的処置または腫瘍の予防の活性に加えて、本発明の蛋白は別の抗腫瘍活性を示す可能性がある。蛋白は直接的に、または例えばADCCを通してのような間接的に腫瘍の増殖を阻害すると考えられる。また蛋白は、腫瘍組織または腫瘍前駆組織に作用することにより、腫瘍の増殖を支持するために必要な組織の形成を阻害する（例えば血管新生を阻害する）ことにより、腫瘍の増殖を阻害する別の因子、活性物質または細胞種を産生することにより、腫瘍の増殖を促進する因子、活性物質または細胞種を除去または阻害することにより腫瘍阻害活性を示す可能性がある。

〔その他の活性〕

15     本発明の蛋白（ポリペプチド）は、以下に示す付加的な活性あるいは効果の一つあるいはそれ以上を示すと考えられる：細菌、ウィルス、カビ、および他の寄生虫を含む感染性の物質を殺傷する；

身長、体重、髪の色、目の色、肌あるいは他の組織の色素沈着、あるいは器官の大きさ（例えば胸部増量あるいは減量）等、身体的特徴を抑制あるいは  
20     促進する効果を及ぼす；

食餌脂肪、蛋白、あるいは炭水化物の分解に効果を示す；

食欲、性欲、ストレス、認識（認識障害）、鬱病、暴力行動を含む行動特徴に効果を及ぼす；

鎮痛効果あるいは他の痛みを減少させる効果を提供する；

25     胚性幹細胞の造血系以外の他の系統への分化および増殖を促進する；

および、酵素の場合、その酵素の欠失を補い、また関連疾患を治療する。

- 上記活性を有する蛋白は、例えば、B細胞、T細胞、肥満細胞の増殖または細胞死、免疫グロブリンのクラススイッチ促進によるクラス特異的誘導、B細胞の抗体産生細胞への分化、顆粒球前駆細胞の増殖または分化、細胞死、単球・マクロファージ前駆細胞の増殖または分化、細胞死、好中球、単球・マクロファージ、好酸球、好塩基球の増殖または機能亢進、細胞死、巨核球前駆細胞の増殖または細胞死、好中球前駆細胞の増殖または分化、細胞死、BまたはT前駆細胞の増殖または分化、細胞死、赤血球の産生促進、赤血球、好中球、好酸球、好塩基球、単球・マクロファージ、肥満細胞、巨核球前駆細胞の増殖支持、好中球、単球・マクロファージ、B細胞またはT細胞の遊走促進、胸腺細胞の増殖または細胞死、脂肪細胞の分化抑制、ナチュラルキラー細胞の増殖または細胞死、造血幹細胞の増殖または細胞死、幹細胞および各種造血前駆細胞の増殖抑制、間葉系幹細胞からの骨芽細胞、軟骨細胞への分化促進または増殖、細胞死、あるいは破骨細胞の活性化や単球から破骨細胞への分化促進による骨吸収の促進の作用を本発明のポリペプチドのみで、
- 15    またリガンド・レセプター間の結合を介して、あるいは他の分子と相乗的に働くことにより有すると考えられる。

- また本発明のペプチドは神経系にも作用することが予測されるので、各種神経伝達物質作動性神経細胞への分化ならびにそれらの生存維持または細胞死、グリア細胞の増殖促進または細胞死、神経突起の伸展、神経節細胞の生存維持または細胞死、アストロサイトの増殖または分化促進または細胞死、末梢神経の増殖または生存維持、細胞死、シュワン細胞の増殖または細胞死、運動神経の増殖または生存維持、細胞死の作用もあると考えられる。
- 20

- さらに、本発明のポリペプチドは初期胚の発生過程において、外胚葉誘導作用による表皮、脳、背骨、神経の器官形成、中胚葉誘導作用による背索結合組織（骨、筋肉、腱）、血球細胞、心臓、腎臓、生殖巣の器官形成、あるいは内胚葉誘導作用による消化器系臓器（胃、腸、肝臓、脾臓）、呼吸器系
- 25



(肺、気管)の形成に促進的または抑制的に作用すると考えられ、成体においても上記器官の増殖あるいは増殖抑制作用を有すると考えられる。

したがって、本発明のポリペプチドはそれ自身で、免疫系または神経系もしくは骨代謝の機能の低下または亢進に関する疾患、または造血系細胞の發育不全または異常増殖、例えば、炎症性疾患（リウマチ、潰瘍性大腸炎等）、  
5 骨髄移植後の造血幹細胞の減少症、ガン、白血病に対する放射線照射または化学療法剤投与後の白血球、血小板、B細胞またはT細胞の減少症、貧血、感染症、ガン、白血病、エイズ（AIDS）、骨代謝異常（骨粗鬆症等）、  
動脈硬化、各種変性疾患（アルツハイマー病、多発性硬化症等）、あるいは  
10 神経損傷の予防または治療薬として用いることが期待される。

また本発明のポリペプチドは、外胚葉、中胚葉または内胚葉由来器官の分化、増殖作用を有すると考えられるので、各器官（表皮、骨、筋肉、腱、心臓、腎臓、胃、腸、肝臓、脾臓、肺、気管等）の組織修復剤として用いることも期待される。

15 また、本発明のポリペプチドのポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を用いて、生体における該ポリペプチドの定量が行なえ、これによって本発明のポリペプチドと疾患との関係の研究あるいは疾患の診断等に利用することができる。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体は本発明のポリペプチドあるいはその断片を抗原として用いて公知の方法により作製  
20 することができる。

また本発明のポリペプチドを用いることにより、例えばアフィニティークラムを作製して、本発明のポリペプチドと結合する既知または未知の蛋白（リガンド）の同定、精製あるいはその遺伝子クローニングを行なうことができる。

25 また本発明のポリペプチドを用いて、例えばウエストーウエスタン法により、または本発明のcDNA（好ましくは本発明のポリペプチドをコードす

る cDNA を用いて、例えば酵母 2-ハイブリッド法により本発明のポリペプチドと相互作用する分子の同定、遺伝子クローニングを行なうこともできる。

- さらに本発明のポリペプチドを用いることによって、本発明のポリペプチドレセプターアゴニスト、アンタゴニストおよび受容体-シグナル伝達分子間の阻害剤等のスクリーニングを行なうこともできる。

スクリーニングは、例えば、以下の方法により行なうことが出来る。すなわち、

- a) 本発明のポリペプチド、スクリーニングすべき化合物、および細胞を含む反応混合物を、細胞が本発明のペプチドにより正常に刺激される条件と一緒にし（該反応混合物は細胞が増殖するに従い細胞中に導入される標識および本発明のペプチドの機能を効果的に観察させるための本発明のペプチド以外のペプチドを含む）；ついで
- b) 細胞の増殖の程度を測定して、対象化合物が有効なアンタゴニストまたはアゴニストであるかどうかを決定する。

より詳細には、以下のようにして行なわれる。すなわち：

- ラット血管平滑筋細胞株（ATCC CRL-1444 または CRL-1476）をプレートにまいて、10%血清存在下で24時間培養した後、望ましくは1, 10または50 ng/ml濃度のヒトPDGF-BB（GENZYME 社製）を含む無血清培地に交換する。A55蛋白のアンタゴニスト活性を有する化合物をスクリーニングする場合は、その際A55蛋白とスクリーニングすべき化合物を同時に添加した後、24時間培養後に<sup>3</sup>H-チミジンを添加し、その4時間培養後に細胞に取りこまれた<sup>3</sup>Hを測定することによって、A55蛋白の<sup>3</sup>H-チミジン取り込抑制活性を阻害する化合物をスクリーニングができる。A55蛋白のアゴニスト活性を有する化合物をスクリーニングする場合は、上記細胞にスクリーニングすべき化合物を添加した後、24時間培養後に<sup>3</sup>H-

チミジンを添加し、その4時間培養後に細胞に取りこまれた<sup>3</sup>Hを測定することによって、<sup>3</sup>H-チミジン取り込抑制活性を有する化合物をスクリーニングができる。

本発明のcDNAは、多大な有用性が期待される本発明のポリペプチドを  
5 生産する際の重要かつ必須の鋳型となるだけでなく、遺伝病の診断や治療（遺伝子欠損症の治療またはアンチセンスDNA（RNA）によって、ポリペプチドの発現を停止させることによる治療等）に利用できる。

また、本発明のcDNAをプローブとしてジェノミック（genomic）DNAを分離できる。同様にして、本発明cDNAと相同性の高いマウスあるいは  
10 ヒトの関連ポリペプチドの遺伝子、またマウスあるいはヒト以外の生物における本発明ポリペプチドと相同性の高いポリペプチドの遺伝子を分離することも可能である。

#### 〔医薬品への適用〕

前記の疾患に適応するために、本発明のポリペプチド、あるいは本発明の  
15 ポリペプチドに対する抗体は通常、全身的又は局所的に、一般的には経口または非経口の形で投与される。好ましくは、経口投与、静脈内投与および脳室内投与である。

投与量は、年齢、体重、症状、治療効果、投与方法、処理時間等により異なるが、通常、成人一人あたり、一回につき、100 $\mu$ gから100mgの  
20 範囲で、一日一回から数回経口投与されるか、または成人一人あたり、一回につき、10 $\mu$ gから100mgの範囲で、一日一回から数回非経口投与される。

もちろん前記したように、投与量は、種々の条件により変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、また範囲を越えて必要な場合  
25 もある。

本発明化合物を投与する際には、経口投与のための固体組成物、液体組成

物およびその他の組成物、非経口投与のための注射剤、外用剤、坐剤等として用いられる。

経口投与のための固体組成物には、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤等が含まれる。カプセルには、ソフトカプセルおよびハードカプセルが含まれる。

5 まれる。

このような固体組成物においては、一つまたはそれ以上の活性物質が、少なくとも一つの不活性な希釈剤（例えば、ラクトース、マンニトール、グルコース、ヒドロキシプロピルセルロース、微結晶セルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム等）と混合される。

10 組成物は、常法に従って、不活性な希釈剤以外の添加物、例えば、潤滑剤（ステアリン酸マグネシウム等）、崩壊剤（繊維素グリコール酸カルシウム等）、安定化剤（ヒト血清アルブミン、ラクトース等）、溶解補助剤（アルギニン、アスパラギン酸等）を含有していてもよい。

錠剤または丸剤は、必要により白糖、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート等の胃溶性あるいは腸溶性のフィルムで被膜してもよいし、また2以上の層で被膜してもよい。さらにゼラチンのような吸収されうる物質のカプセルも包含される。

経口投与のための液体組成物は、薬学的に許容される乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、エリキシル剤等を含み、一般に用いられる不活性な希釈剤（例えば、精製水、エタノール等）を含んでいてもよい。この様な組成物は、不活性な希釈剤以外に湿潤剤、懸濁剤のような補助剤、甘味剤、風味剤、芳香剤、防腐剤を含有していてもよい。

経口投与のためのその他の組成物としては、ひとつまたはそれ以上の活性物質を含み、それ自体公知の方法により処方されるスプレー剤が含まれる。

25 この組成物は不活性な希釈剤以外に亜硫酸水素ナトリウムのような安定剤と等張性を与えるような安定化剤、塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウムある

いはクエン酸のような等張剤を含有していてもよい。スプレー剤の製造方法は、例えば米国特許第 2,868,691 号および同第 3,095,355 号明細書に詳しく記載されている。

本発明による非経口投与のための注射剤としては、無菌の水性または非水性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤を包含する。水性または非水性の溶液剤、懸濁剤としては、一つまたはそれ以上の活性物質が、少なくとも一つの不活性な希釈剤と混合される。水性の希釈剤としては、例えば注射用蒸留水および生理食塩水が挙げられる。非水性の希釈剤としては、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類、ポリソルベート 80（登録商標）等が挙げられる。

このような組成物は、さらに防腐剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ラクトース等）、溶解補助剤（例えば、アルギニン、アスパラギン酸等）のような補助剤を含んでいてもよい。

#### 15 発明を実施するための最良の形態

以下に本発明の A55 クローンに関する実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を制限するものではない。

#### 実施例 1 : poly (A)<sup>+</sup>RNA の調製

20 マウス 18.5 日胎児心臓組織より TRIzol 試薬 (TRIzol reagent, 登録商標、GIBCOBRL より購入) を用いて全 RNA を抽出し、mRNA ピュリフィケーション・キット (mRNA Purification Kit, 商品名、Pharmacia より購入) を用いて poly (A)<sup>+</sup>RNA を精製した。

#### 25 実施例 2 : 酵母 S S T cDNA ライブラリーの作製

上記の poly (A)<sup>+</sup>RNA を鋳型に Xho I 部位を連結したランダム 9

mer : 5' - CGATTGAATTCTAGACCTGCCTCGAGN  
NNNNNNNN - 3' (配列番号 11) をプライマーとして、スーパースク  
リプト・プラスミド・システム (SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis  
and Plasmid Cloning, 商品名、GIBCOBRL より購入) を用いて 2 本鎖 cDNA  
5 の合成を行なった。EcoRI アダプター (GIBCOBRL より購入) を DNA  
ライゲーションキット (DNA ligation kit ver.2, 商品名、宝酒造 (株) より購  
入。以下 cDNA の連結はすべて本キットを使用した。) を用いて連結した  
後、XhoI で消化し、アガロース電気泳動で 300 ~ 800 bp の cDN  
A を切り出して分画し、pSUC2 (米国特許 5,536,637 号参照) の EcoR  
10 I / NotI 部位に連結し、大腸菌 DH10B 株にエレクトロポレーション  
法で形質転換して酵母 SST 用の cDNA ライブラリーを得た。

実施例 3 : SST によるスクリーニングおよび SST 陽性クローンの塩基配  
列の決定

15 この cDNA ライブラリーのプラスミドを調製し、酢酸リチウム法 (Current  
Protocols In Molecular Biology 13.7.1 を参照) により酵母 YTK12 株を形質転  
換し、トリプトファン (Trp) 不含の酵母形質転換体の選択培地 (CMD  
- Trp 培地) のプレート上にまいた。30℃ で 48 時間インキュベートし  
た後、アキュトラン・レプリカ・プレーター (Accutran Replica Plater, 商品名、  
20 Schleicher & Schuell より購入) を用いて得られたコロニー (形質転換体) のレ  
プリカをラフィノースを炭素源とする YPR プレートにとり、30℃ で 14  
日間インキュベートした。3 日目以降、出現してきた各々のコロニーを一つ  
ずつ再度 YPR プレートにストリークして 30℃ で 48 時間インキュベート  
した後、シングルコロニーを YPD 培地に植菌し、30℃ で 48 時間インキ  
25 ュベートした後、プラスミドを調製した。続いて pSUC2 のクローニング  
サイトの両端の配列の 2 種類のプライマー (センス鎖はビオチン化プライマ

一)を用いて公知の方法に従ってPCRを行ない、インサートcDNAを増幅した後、ダイナビーズ(Dynabeads, 商品名、DYNALより購入)を用いてビオチン化1本鎖cDNAを精製し、塩基配列の決定を行なった。

塩基配列の決定はDNAシーケンシング・キット(DNA Sequencing kit (Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction), 商品名、Applied Biosystems Inc.より購入)を用いた蛍光ダイターミネーターサイクルシーケンス法で反応を行ない、自動DNAシーケンサー373 (Applied Biosystems Inc.)で読み取りを行なった(以下、降塩基配列決定はすべて本方法で行なった。))。

得られた塩基配列および推定されるアミノ酸配列についてデータベースとの相同性検索を行ない、A55と名付けられたクローンがデータベースに登録されていない新規のcDNAであることが明らかとなった。そこでこのA55クローンの断片cDNA(以下、A55 SST断片cDNAと呼ぶ)について全長cDNAのクローニングを試みた。また推定されるアミノ酸配列を既知のシグナルペプチドと比較することによりA55 SST断片cDNAが機能的かつ構造的にもシグナルペプチドを有することを確認した。

#### 実施例4：全長cDNAのクローニングおよび全塩基配列の決定

マウス13日胎児心臓cDNAライブラリー(Uni-ZAP XR) (Stratagenより購入)のファージ粒子を大腸菌XL1-Blue MRF\*株に感染させて得られた100万プラークをナイロンメンブレンにトランスファーした。<sup>32</sup>P標識したマウスA55 SST断片cDNAをプローブとしてプラークハイブリダイゼーションを行ない、多数の陽性プラークを得た。

その中の1プラークからファージを調製し、エクスアシスト・ヘルパー・ファージ(ExAssist helper phage, Stratageneより購入)と共に大腸菌XL1-Blue MRF\*株(Stratageneより購入)に感染させ、ファージミド(pBluescript SK(-))に変換した。ファージミドを大腸菌DH5a株に感染させた後、形質転

換体よりプラスミドを調製した。初めに5'側の塩基配列を決定してマウス A 5 5 S S T断片 c D N Aの塩基配列が存在することを確認した後、全塩基配列を決定し、配列番号3に示す配列を得た。

さらにオープンリーディングフレームを決定し、配列番号2に示すアミノ酸翻訳領域および配列番号1に示す推定アミノ酸配列を得た。本発明のペプチドの成熟蛋白は、配列番号3に示される(配列番号3のアミノ酸配列144~1418間の領域)425アミノ酸、または配列番号4に示される423アミノ酸であると推定される。配列番号5は、配列番号4のポリペプチドの翻訳領域を表わす。

10 核酸配列データベースに登録されている既知の核酸配列に対して BLASTN および FASTA により、またアミノ酸配列データベースに登録されている既知のポリペプチドのアミノ酸配列に対して BLASTX、BLASTP および FASTA により検索した結果、本発明のポリペプチド(マウス A 5 5 ポリペプチドと呼ぶ)およびそれをコードする核酸配列と一致する配列はなかった。

15 さらに得られたアミノ酸配列の疎水性プロットによる解析から、本発明のマウス A 5 5 ポリペプチドは膜貫通領域を持たないことも明らかとなり、本発明のマウス A 5 5 ポリペプチドは、新規の分泌蛋白質であることが判明した。

しかし、モチーフ検索の結果から、マウス A 5 5 クローンは6カ所の E G F様ドメインを有することが判明した。この結果に基づいて、マウス A 5 5 クローンは、少なくとも E G Fファミリーと同様な活性を保持すると期待される。また BLASTX、BLASTP および FASTA は、マウス A 5 5 クローン(配列番号1のアミノ酸配列1~448間の領域)とヒト S 1-5 (Swiss Prot Accession HSU03877のアミノ酸配列1~387間の領域)の間に有為な相同性があることを示した。ヒト S 1-5は繊維芽細胞より増殖抑制時期に発現  
25 が誘導される分泌蛋白で、細胞増殖に関連した活性を有することが報告され



ている (Beata Lecka-Czernik et. al. Mol.Cell.Biol.15 120-128 1995)。さらにその他の EGF 様ドメインを有する多くの蛋白とも相同性を示した。

#### 実施例 5 : マウス A55 蛋白アイソフォーム遺伝子の単離

- 5 転写開始点を決定するためにマラソン cDNA アンプリフィケーションキット (Marathon cDNA Amplification Kit, 商品名、Clontech 社より購入) による 5' RACE (Rapid Amplification of cDNA End) 法を用いて 5' 末端 cDNA のクローニングを行なった。鋳型 2 本鎖 cDNA の調製には、マウス胎児心臓組織の poly (A)<sup>+</sup>RNA より作製した。
- 10 全長の塩基配列の情報に基づいてプライマー mA55-R1 : 5' - CGTTTG TGCACTGCTGCTGTGCATTCC - 3' (配列番号 12) を作製して、該キットに添付されたアダプタープライマーとで PCR を行なった。増幅された cDNA をアガロース電気泳動で分画後、pGEM-T Vector (商品名、Promega より購入) に連結し、大腸菌 DH5 $\alpha$  に形質転
- 15 換してプラスミドを調製し、全塩基配列を決定した。その結果、配列番号 3 で示された翻訳開始点 ATG を含む 5' 末端配列と異なる 5' 末端配列を有するクローンを見い出した (配列番号 7 および 8)。

- 染色体遺伝子の解析から、配列番号 8 で示されたクローンは配列 3 で示されたクローンのエクソン 1 部分が約 400 塩基下流に存在する別のエクソン
- 20 を利用しており、選択的スプライシングによって生じたクローンであることが判明した。その結果該クローンは配列番号 1 で示された N 末端の 6 アミノ酸が 19 アミノ酸に置換されたアイソフォーム蛋白 (配列番号 6 に示す) をコードすることが判明した。

- 本発明のペプチドの成熟蛋白は、配列番号 8 に示される (配列番号 8 のア
- 25 ミノ酸配列 340 ~ 1614 間の領域) 425 アミノ酸または、配列番号 9 に示される 423 アミノ酸であると推定される。配列番号 10 は、配列番号 9 の

ポリペプチドの翻訳領域を表わす。

#### 実施例 6 : 哺乳動物細胞を用いたマウス A 5 5 蛋白の発現

配列番号 3 で示されたマウス全長 cDNA を哺乳動物細胞用発現ベクター  
5 pN o t S (Kaufman et al., Nucleic Acids Res.19,4485-4490(1991)参照) に連結  
し、マウス A 5 5 蛋白発現用プラスミド pN o t S - m A 5 5 を構築した。  
pN o t S および pN o t S - m A 5 5 をリポフェクチン (商品名、  
GIBCOBRL より購入) を用いて 2 9 3 T 細胞 (ATCC CRL-1573 2 9 3 細胞  
10 に S V 4 0 T 抗原を導入した細胞株) に導入し、1 9 時間後に  $^{35}$ S - メチオ  
ニン (M e t) を添加した M e t フリーの培地に交換して 3 0 分間ラベルし  
た後、M e t を含む培地で 5 時間培養を行なった。細胞上清を回収後、セン  
トリコンー 1 0 (商品名、Amicon より購入) にて約 1 0 倍に濃縮し、S D S  
- P A G E を行なった。アクリルアミドゲルを乾燥させた後、 $^{35}$ S でラベル  
された蛋白質の発現を B A S 2000 (富士フィルム) を用いて検出した。

15 その結果 pN o t S - m A 5 5 を導入した 2 9 3 T 細胞の培養上清には、  
発現ベクター pN o t S のみを導入した 2 9 3 T 細胞の培養上清には認めら  
れないバンドが 6 0 ~ 7 0 k D a 付近に検出された。このことから組み換え  
マウス A 5 5 蛋白が発現し、培養上清中に分泌していることが確認された。

このマウス A 5 5 組み換え蛋白の分子量はアミノ酸組成から計算されるマ  
20 ウス A 5 5 の分子量 4 8 k D a よりも大きく、マウス A 5 5 蛋白には 2 ケ所  
の N 型糖付加部位と O 型糖鎖が付加しうる S e r および T h r 残基が多数存  
在することから、N 型および O 型糖鎖が付加されていると予想された。

#### 実施例 7 : マウス A 5 5 蛋白によるラット血管平滑筋細胞増殖阻害作用の測

25 定

新生化学実験講座 1 0 「血管 内皮と平滑筋」 (日本生化学会編) に記載

の方法に従い、ラットの心臓から横隔膜に至る大動脈より血管平滑筋細胞を単離し初代培養を行なった。

ヒトPDGF-BB (GENZYME 社製) 1, 3 または 10 ng/ml と同時に、実施例 6 の方法で pN o t S または pN o t S - m A 5 5 を導入した  
5 2 9 3 T 細胞の培養上清を全培地量の 10 % になるように添加し、細胞増殖 ELISA, BrdU 発色キット (商品名、ベーリンガーマンハイムより購入) の方法にしたがって、血管平滑筋細胞の BrdU の取り込を測定した。

その結果、図 1 で示すように、ラット血管平滑筋細胞は pN o t S のみを導入した 2 9 3 T 細胞の培養上清を添加した場合は無添加の場合と比較して  
10 無影響であったが、pN o t S - m A 5 5 を導入した 2 9 3 T 細胞の培養上清を添加した場合は有意な BrdU の取り込み阻害が認められた。

また PDGF を 1, 3, 10 ng/ml の濃度で添加して、濃度依存的にラット血管平滑筋細胞における BrdU の取り込みを上昇させた場合においても、pN o t S のみを導入した 2 9 3 T 細胞の培養上清を同時に添加した  
15 場合は無添加の場合と比較して無影響であったが、pN o t S - m A 5 5 を導入した 2 9 3 T 細胞の培養上清を添加した場合には有意な BrdU の取り込み阻害が認められた (図 1 参照)。

このことから、組み換えマウス A 5 5 蛋白は血管平滑筋細胞に対して増殖阻害活性を有することが明らかとなった。

20

実施例 8 : 抗マウス A 5 5 蛋白ポリクローナル抗体の作製

固相法により合成した 3 種類のマウス A 5 5 部分ペプチド

RTNPVYRGPYSNPYSTSYSG (71-90) (配列番号 1 の 48-67)

25 GAYYIFQIKSGNEGREFYMR (376-395) (配列番号 1 の 353-372)

MTRPIKGPRDIQLDLEMITVN (406-426) (配列番号1の383~403)

を免疫原としてウサギに免疫して、抗体価の測定後血清を採取した。得られた血清を各々免疫原としたペプチド断片を結合させたアフィニティーカラム

- 5 により抗マウスA55蛋白ポリクローナル抗体を精製した。

実施例6と同じ方法で調製した培養上清をSDS-PAGEにかけた後、蛋白をアクリルアミドゲルからイモビロナーP (PVDF膜、商品名、ミリポアより購入) にトランスファーした。作製した抗マウスA55ポリクローナル抗体を一次抗体としてECLキット (商品名、アマシャムより購入) を

- 10 用いて発色し、組み換えマウスA55蛋白を検出した。

その結果、マウスA55発現ベクターpNotS-mA55を導入した細胞の培養上清には実施例7で記載した<sup>35</sup>Sラベルの実験と同じ位置である60kDa付近に単一のバンドが検出された。一方発現ベクターpNotSのみを導入した細胞の上清には60kDa付近にバンドは検出されなかった。

- 15 このことから得られたポリクローナル抗体はマウスA55蛋白を特異的に認識していることが確認された。

## 請求の範囲

1. 実質的に純粋な形である配列番号 1、4、6 または 9 で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、そのホモログ、そのフラグメントまたはそのフラグメントのホモログからなるポリペプチド。  
5
2. 配列番号 1、4、6 または 9 で示されるアミノ酸配列からなる請求の範囲第 1 項記載のポリペプチド。
- 10 3. 請求の範囲第 1 項に記載されたポリペプチドをコードする cDNA。
4. 配列番号 2、5、7 または 10 で示される塩基配列からなる請求の範囲第 3 項記載の cDNA、またはその配列に選択的にハイブリダイズするフラグメントからなる cDNA。
- 15 5. 配列番号 3 または 8 で示される塩基配列からなる請求の範囲第 3 項記載の cDNA、またはその配列に選択的にハイブリダイズするフラグメントからなる cDNA。
- 20 6. 請求の範囲第 3 項から第 5 項のいずれかの項に記載の cDNA からなる複製または発現ベクター。
7. 請求の範囲第 6 項記載の複製または発現ベクターで形質転換された宿主細胞。
- 25 8. 請求の範囲第 1 項または第 2 項に記載されたポリペプチドを発現させる

ための条件下で請求の範囲第 7 項記載の宿主細胞を培養することからなる該ポリペプチドの製造方法。

9. 請求の範囲第 1 項または第 2 項に記載されたポリペプチドのモノクローナルまたはポリクローナル抗体。

10. 請求の範囲第 1 項または第 2 項に記載されたポリペプチドまたは請求の範囲第 9 項記載の抗体および薬学的に許容される賦形剤および／または担体を含有することを特徴とする薬学的組成物。

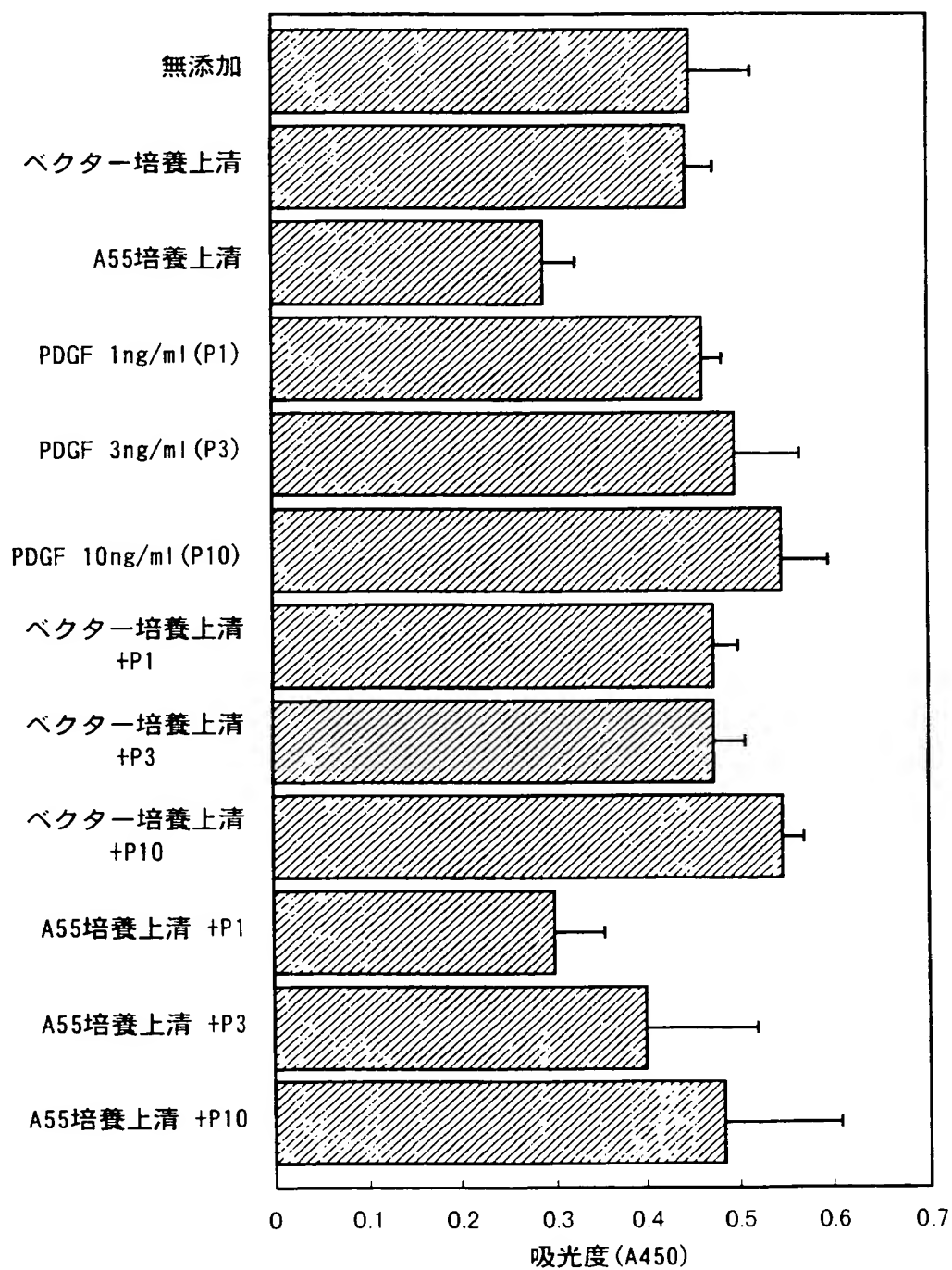
10

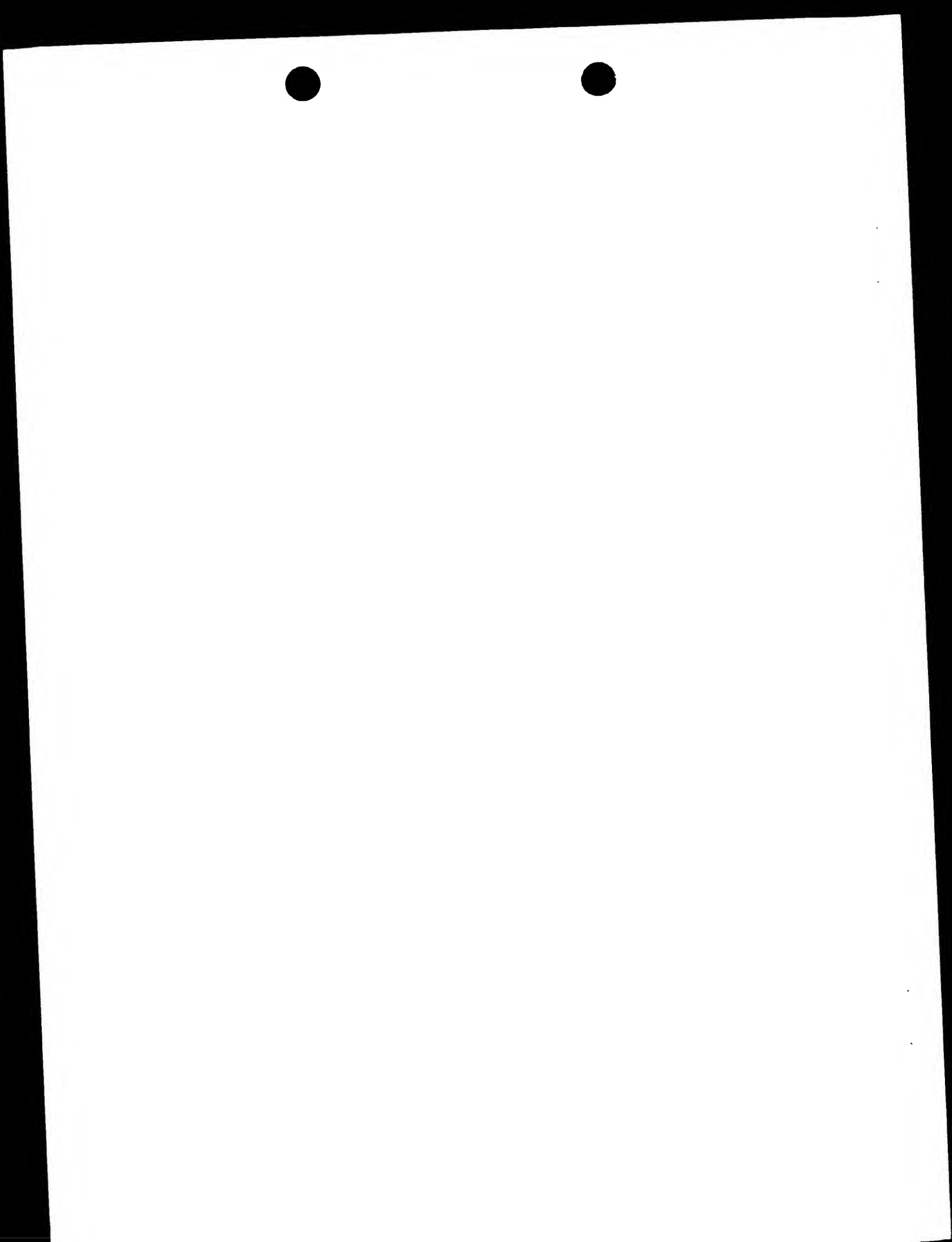
11. 請求の範囲第 1 項または第 2 項に記載されたポリペプチドおよび薬学的に許容される賦形剤および／または担体を含有することを特徴とする異常な平滑筋の増殖に係る疾患の治療に有効な薬学的組成物。

- 15 12. 請求の範囲第 1 項または第 2 項に記載されたポリペプチドおよび薬学的に許容される賦形剤および／または担体を含有することを特徴とする動脈硬化または経皮的冠動脈形成術（PTCA）後の再狭窄をもたらす血管内膜肥厚、筋腫の治療に有効な請求の範囲第 11 項記載の薬学的組成物。

- 20 13. 請求の範囲第 1 項または第 2 項に記載されたポリペプチドを用いて、該ポリペプチドに対するアンタゴニストまたはアゴニストとしての活性を有する化合物をスクリーニングする方法。

図 1







## SEQUENCE LISTING

<110> Ono Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Novel polypeptides, cDNA coding these polypeptides and Use thereof

<130> ONF-2969PCT

<141> 1999-04-28

<150> JP 10-119731

<151> 1998-04-28

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 448

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Met Pro Gly Leu Lys Arg Ile Leu Thr Val Thr Ile Leu Ala Leu Trp

-23

-20

-15

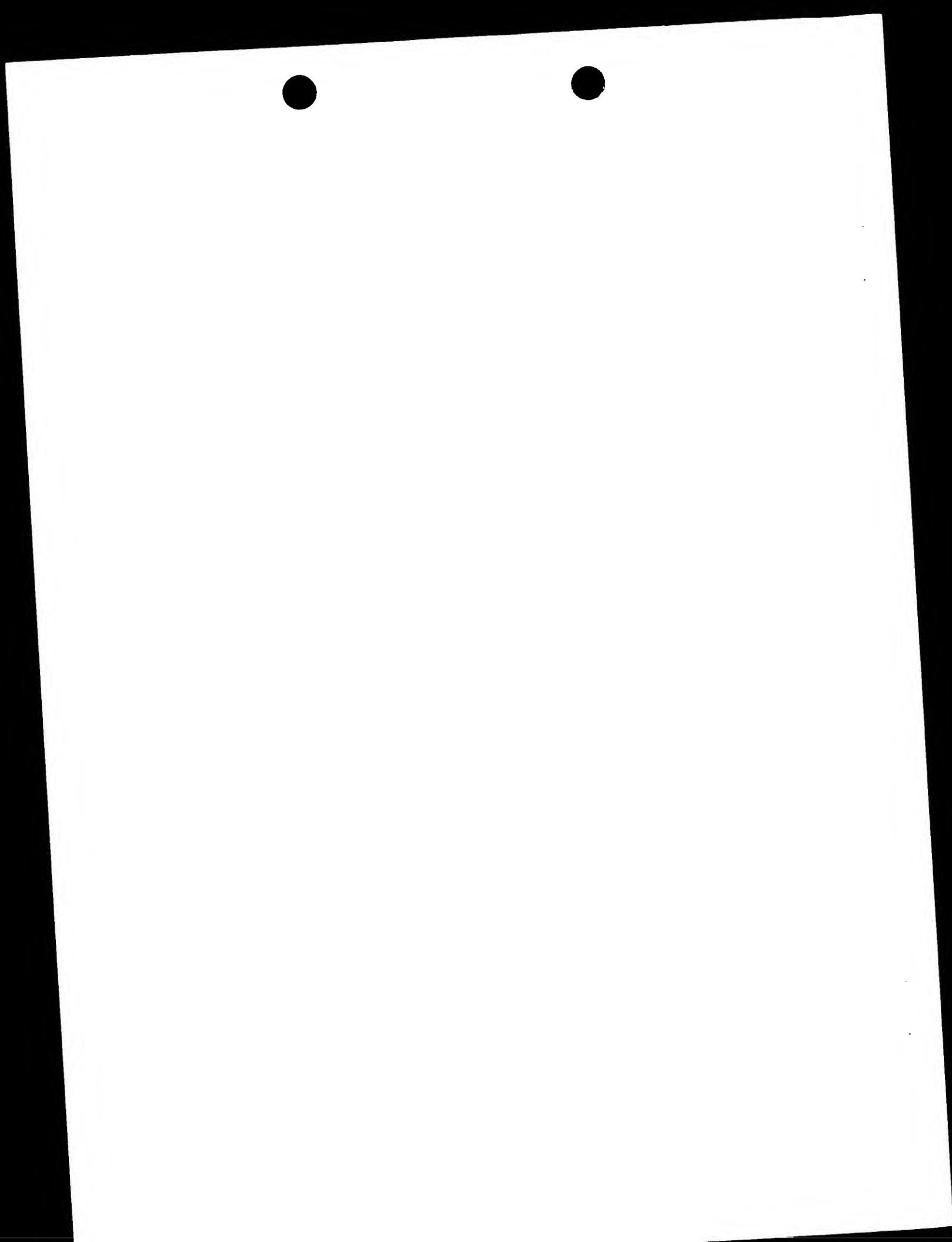
-10

Leu Pro His Pro Gly Asn Ala Gln Gln Gln Cys Thr Asn Gly Phe Asp

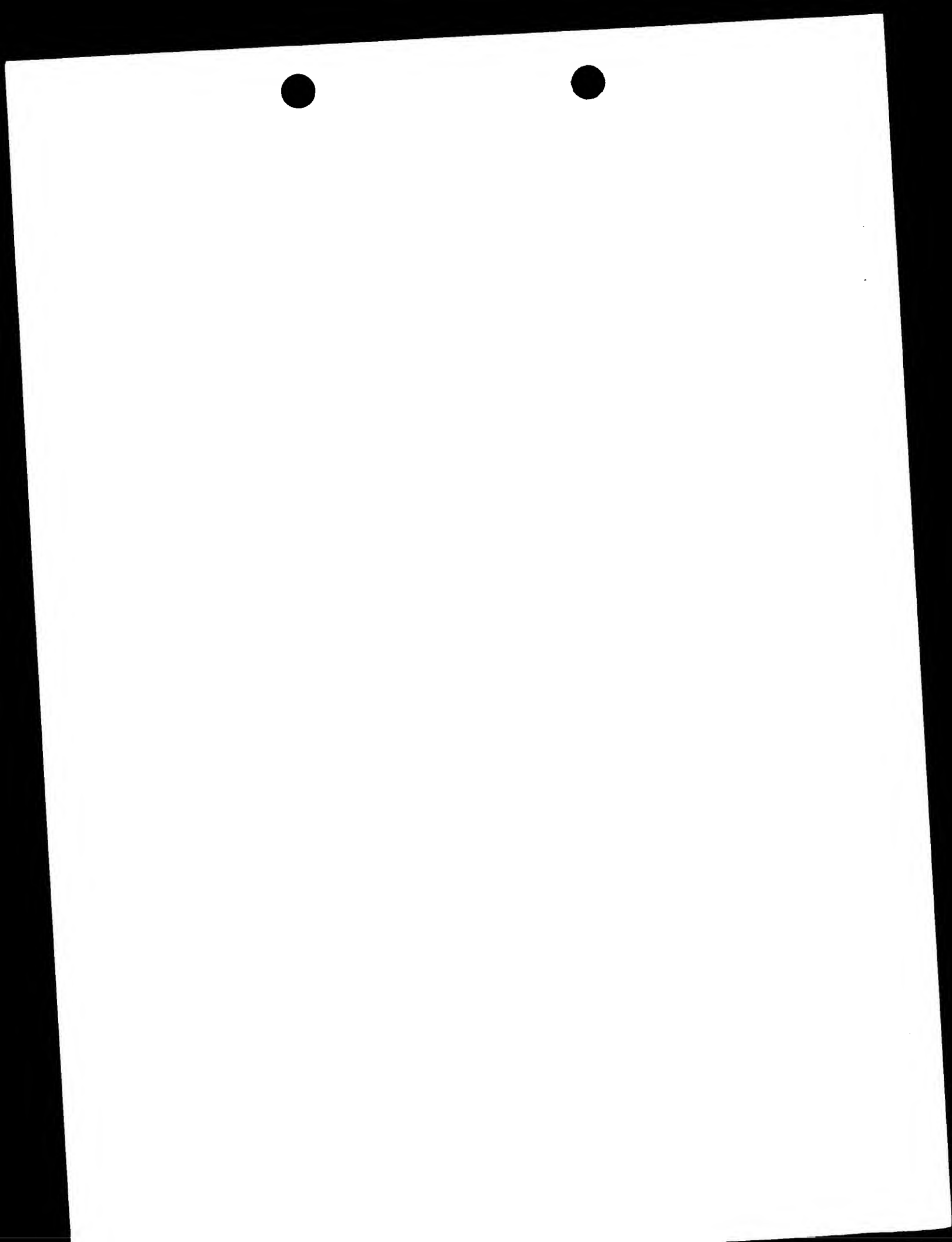
-5

1

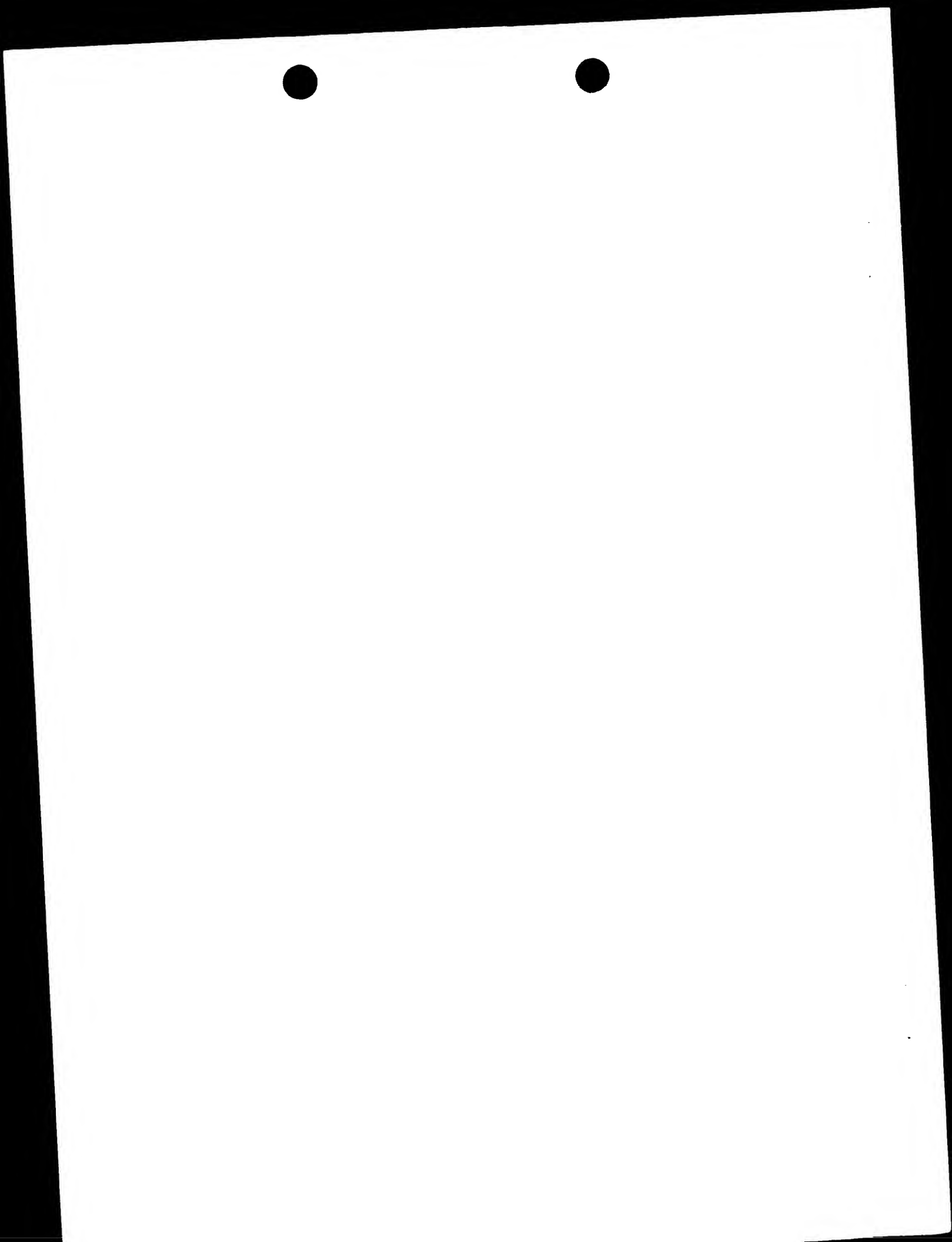
5



Leu Asp Arg Gln Ser Gly Gln Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Thr  
10 15 20 25  
Ile Pro Glu Ala Cys Arg Gly Asp Met Met Cys Val Asn Gln Asn Gly  
30 35 40  
Gly Tyr Leu Cys Ile Pro Arg Thr Asn Pro Val Tyr Arg Gly Pro Tyr  
45 50 55  
Ser Asn Pro Tyr Ser Thr Ser Tyr Ser Gly Pro Tyr Pro Ala Ala Ala  
60 65 70  
Pro Pro Val Pro Ala Ser Asn Tyr Pro Thr Ile Ser Arg Pro Leu Val  
75 80 85  
Cys Arg Phe Gly Tyr Gln Met Asp Glu Gly Asn Gln Cys Val Asp Val  
90 95 100 105  
Asp Glu Cys Ala Thr Asp Ser His Gln Cys Asn Pro Thr Gln Ile Cys  
110 115 120  
Ile Asn Thr Glu Gly Gly Tyr Thr Cys Ser Cys Thr Asp Gly Tyr Trp  
125 130 135  
Leu Leu Glu Gly Gln Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Tyr Gly Tyr  
140 145 150  
Cys Gln Gln Leu Cys Ala Asn Val Pro Gly Ser Tyr Ser Cys Thr Cys  
155 160 165  
Asn Pro Gly Phe Thr Leu Asn Asp Asp Gly Arg Ser Cys Gln Asp Val  
170 175 180 185  
Asn Glu Cys Glu Thr Glu Asn Pro Cys Val Gln Thr Cys Val Asn Thr  
190 195 200  
Tyr Gly Ser Phe Ile Cys Arg Cys Asp Pro Gly Tyr Glu Leu Glu Glu  
205 210 215



Asp Gly Ile His Cys Ser Asp Met Asp Glu Cys Ser Phe Ser Glu Phe  
220 225 230  
Leu Cys Gln His Glu Cys Val Asn Gln Pro Gly Ser Tyr Phe Cys Ser  
235 240 245  
Cys Pro Pro Gly Tyr Val Leu Leu Asp Asp Asn Arg Ser Cys Gln Asp  
250 255 260 265  
Ile Asn Glu Cys Glu His Arg Asn His Thr Cys Thr Ser Leu Gln Thr  
270 275 280  
Cys Tyr Asn Leu Gln Gly Gly Phe Lys Cys Ile Asp Pro Ile Ser Cys  
285 290 295  
Glu Glu Pro Tyr Leu Leu Ile Gly Glu Asn Arg Cys Met Cys Pro Ala  
300 305 310  
Glu His Thr Ser Cys Arg Asp Gln Pro Phe Thr Ile Leu Tyr Arg Asp  
315 320 325  
Met Asp Val Val Ser Gly Arg Ser Val Pro Ala Asp Ile Phe Gln Met  
330 335 340 345  
Gln Ala Thr Thr Arg Tyr Pro Gly Ala Tyr Tyr Ile Phe Gln Ile Lys  
350 355 360  
Ser Gly Asn Glu Gly Arg Glu Phe Tyr Met Arg Gln Thr Gly Pro Ile  
365 370 375  
Ser Ala Thr Leu Val Met Thr Arg Pro Ile Lys Gly Pro Arg Asp Ile  
380 385 390  
Gln Leu Asp Leu Glu Met Ile Thr Val Asn Thr Val Ile Asn Phe Arg  
395 400 405  
Gly Ser Ser Val Ile Arg Leu Arg Ile Tyr Val Ser Gln Tyr Pro Phe  
410 415 420 425



<210> 2

<211> 1344

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 2

atgccaggat taaaaaggat actcacigt t accatcttgg cactctgget tccacatcct 60  
gggaatgcac agcagcagt cacaaacggc tttagacctg accgccagtc aggacagtgt 120  
ctagatatitg atgaatgccg gaccatccct gaggccttgc gtggggacat gatgtgtgtc 180  
aaccagaaig gcgggtatit gtgcatecct cgaaccaacc cagtgtatcg agggcccttac 240  
tcaaatccct actctacatc ctactcaggc ccatacccag cagcggcccc accagttacca 300  
gtctccaact accccacgat ttcaaggcct ctgtcttgc gctttgggtt tcagatggat 360  
gaaggcaacc agtgtgtgga tgtggacgag tgtgcaacag actcacacca gtgcaacctt 420  
accagatct gtatcaacac tgaaggaggt tacacctgt cctgcaccga tgggtacttg 480  
cttctggaag ggcagtgcct agatatigat gaatgtcgt atggtttact ccagcagctc 540  
tgtgcaaatg ttccaggatc ctattcctgt acatgcaacc ctggtttcac cctcaacgac 600  
gatggaaggi cttagcaaga tgtgaacgag tgcgaaactg agaattccctg tgttcagacc 660  
tgtgtcaaca cctatggctc ttctatctgc cgtcttgacc caggataiga acttgaggaa 720  
gatggcattc actgcagtga tatggacgag tgcagcttct ccgagttcct ctgtcaacac 780  
gagtgtgtga accagccggg ctcatattc tgcctctgct ctccaggcta cgtcctgttg 840  
gatgataacc gaagctgcca ggataatcaat gaatgtgagc accgaaacca cactgtiacc 900  
tactgcaga ctgtctaaa tctacaaggg ggcttcaaat gtatigatcc catcagctgt 960  
gaggagcctt atctgtgat tggtagaaac cgtctgtatg gtctctgcta gcacaccage 1020  
tgcagagacc agccattcac catcctgtat cgggacatgg atgtgggtgc aggacgcctc 1080





gttccctgcig acatcttcca gatgcaagca acaaccgat accctgggtgc ctattacatt 1140  
ttccagatca aatctggcaa cgagggtcga gatttctata igcggcaaac agggcctatc 1200  
agtgccaccc tggatgatgac acgcccctac aaagggcctc gggacatcca gctggacttg 1260  
gagatgatca ctgtcaacac tgtcatcaac ttcagaggca gctccgtgat ccgactgcgg 1320  
atatatgtgt cgcagtatcc gttc 1344

<210> 3

<211> 2233

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<223> Clone mouse A55 derived from Day 13 mouse embryonic heart

<220>

<221> CDS

<222> (75).. (1418)

<220>

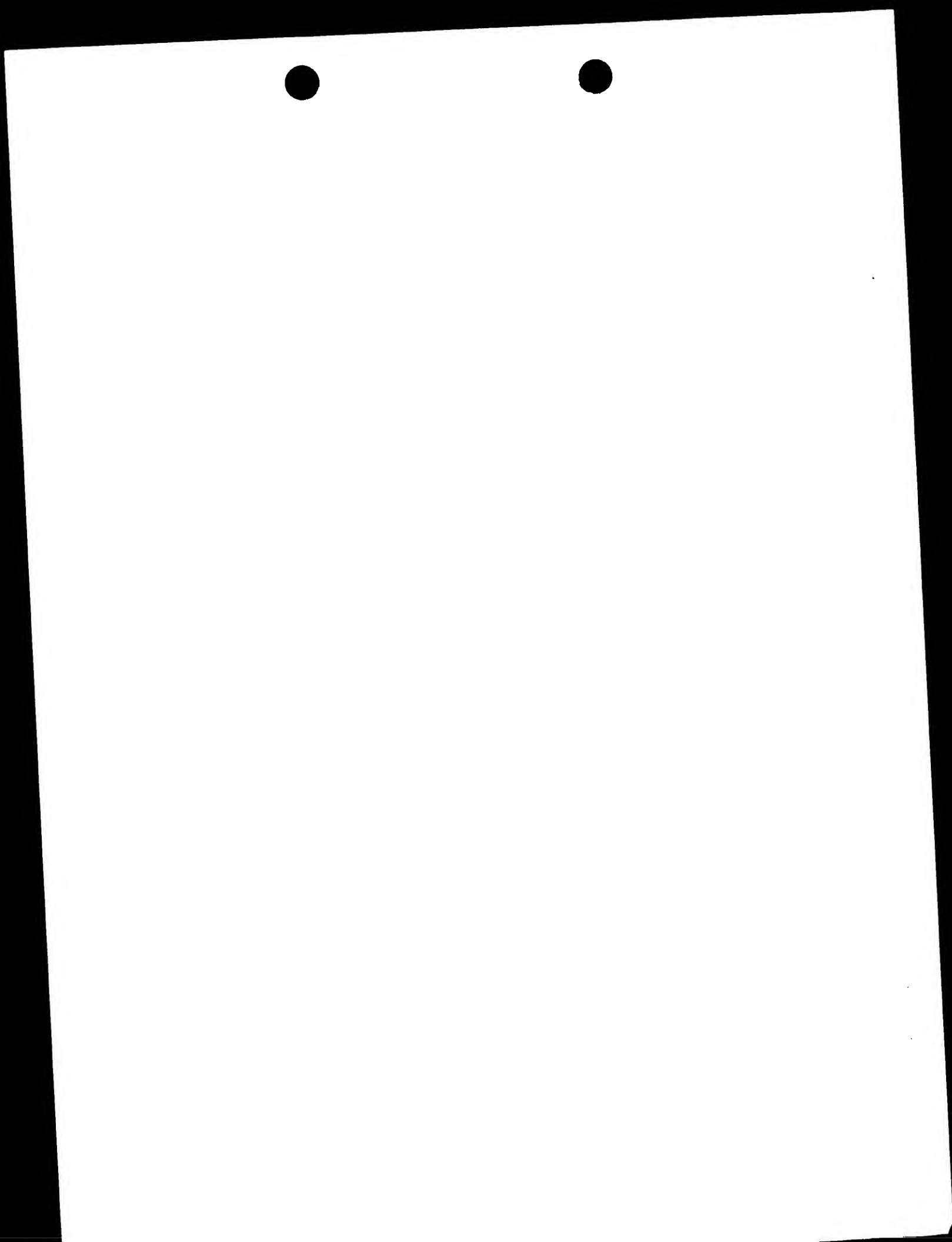
<221> sig\_peptide

<222> (75).. (143)

<220>

<221> mat\_peptide

<222> (144).. (1418)



&lt;400&gt; 3

aattcggcac gagccccagt cccaccgcag agcctgccct cctcgcgtcg ctctcctcc 60  
 cgcgcatctt ggat atg cca gga tta aaa agg ata ctc act gtt acc atc 110

Met Pro Gly Leu Lys Arg Ile Leu Thr Val Thr Ile

-20

-15

ttg gca ctc tgg ctt cca cat cct ggg aat gca cag cag cag tgc aca 158  
 Leu Ala Leu Trp Leu Pro His Pro Gly Asn Ala Gln Gln Gln Cys Thr

-10

-5

-1 1

5

aac ggc ttt gac ctg gac cgc cag tca gga cag tgt cta gat att gat 206  
 Asn Gly Phe Asp Leu Asp Arg Gln Ser Gly Gln Cys Leu Asp Ile Asp

10

15

20

gaa tgc cgg acc atc cct gag gct tgt cgt ggg gac atg atg tgt gtc 254  
 Glu Cys Arg Thr Ile Pro Glu Ala Cys Arg Gly Asp Met Met Cys Val

25

30

35

aac cag aat ggc ggg tat ttg tgc atc cct cga acc aac cca gtg tat 302  
 Asn Gln Asn Gly Gly Tyr Leu Cys Ile Pro Arg Thr Asn Pro Val Tyr

40

45

50

cga ggg cct tac tca aat ccc tac tct aca tcc tac tca ggc cca tac 350  
 Arg Gly Pro Tyr Ser Asn Pro Tyr Ser Thr Ser Tyr Ser Gly Pro Tyr

55

60

65

cca gca gcg gcc cca cca gta cca gct tcc aac tac ccc acg att tca 398  
 Pro Ala Ala Ala Pro Pro Val Pro Ala Ser Asn Tyr Pro Thr Ile Ser

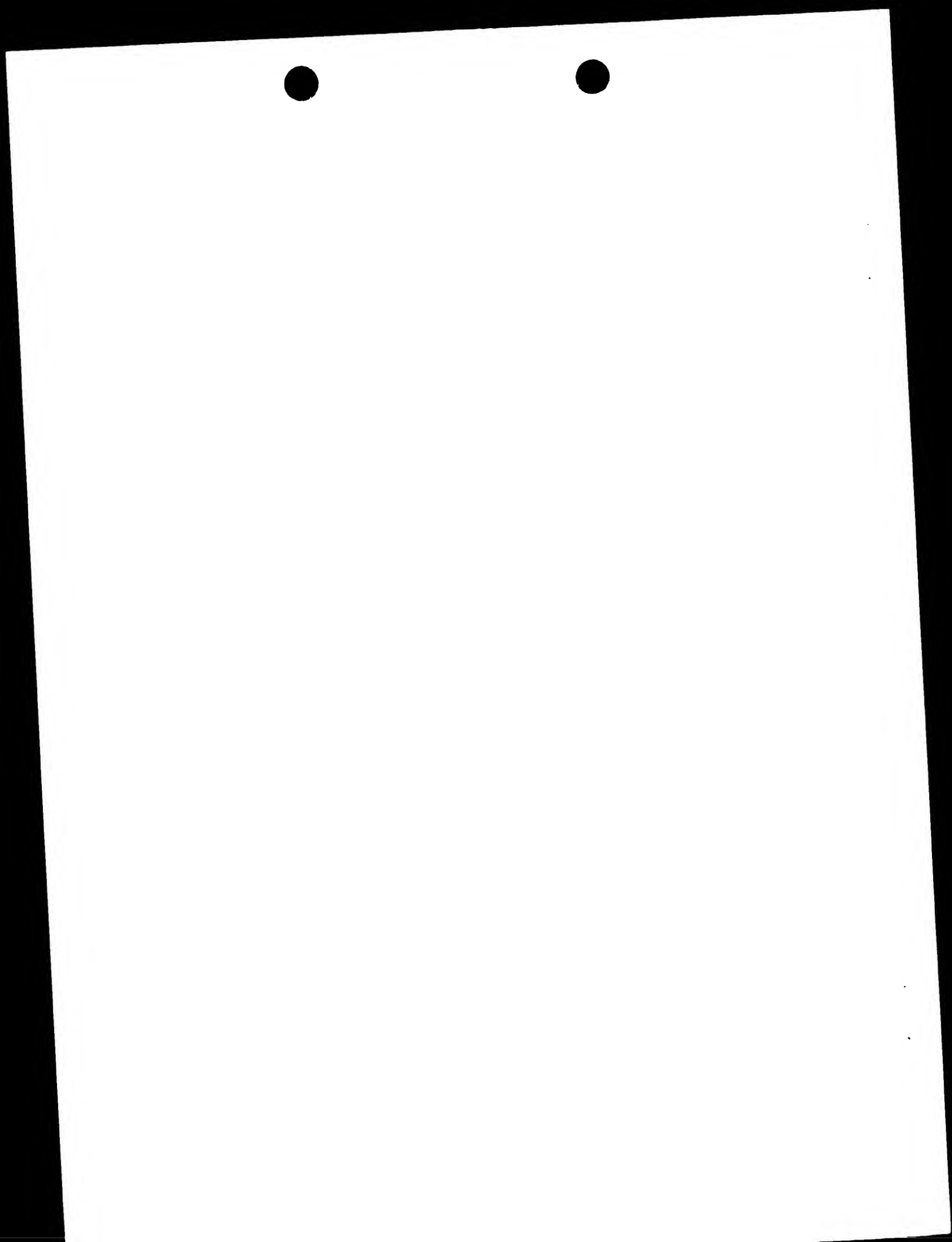
70

75

80

85

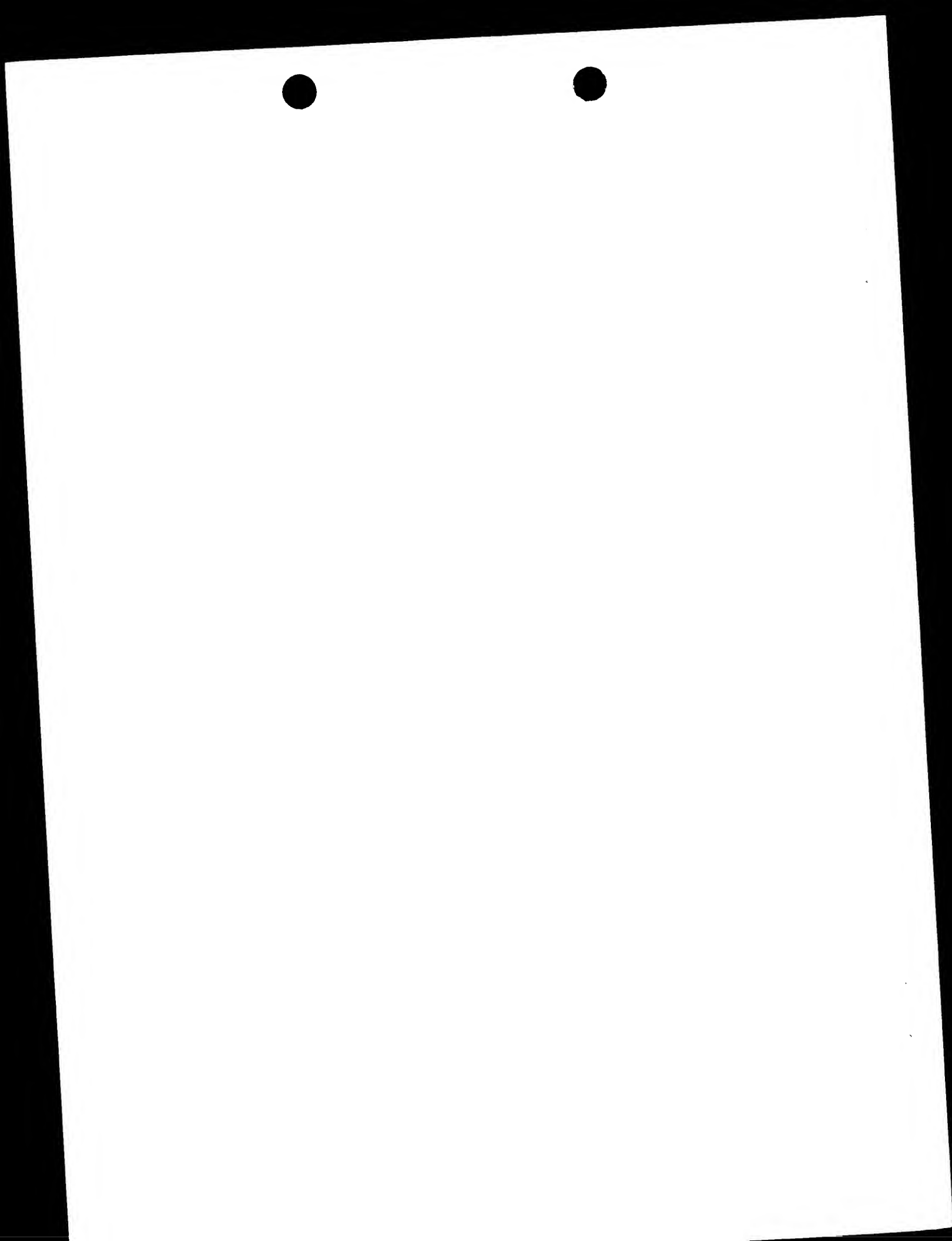
agg cct ctt gtc tgc cgc ttt ggg tat cag atg gat gaa ggc aac cag 446  
 Arg Pro Leu Val Cys Arg Phe Gly Tyr Gln Met Asp Glu Gly Asn Gln



90	95	100	
tgt gtg gat gtg gac gag tgt gca aca gac tca cac cag tgc aac cct			494
Cys Val Asp Val Asp Glu Cys Ala Thr Asp Ser His Gln Cys Asn Pro			
105	110	115	
acc cag atc tgt atc aac act gaa gga ggt tac acc tgc tcc tgc acc			542
Thr Gln Ile Cys Ile Asn Thr Glu Gly Gly Tyr Thr Cys Ser Cys Thr			
120	125	130	
gat ggg tac tgg ctt ctg gaa ggg cag tgc cta gat att gat gaa tgt			590
Asp Gly Tyr Trp Leu Leu Glu Gly Gln Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys			
135	140	145	
cgc tat ggt tac tgc cag cag ctc tgt gca aat gtt cca gga tcc tat			638
Arg Tyr Gly Tyr Cys Gln Gln Leu Cys Ala Asn Val Pro Gly Ser Tyr			
150	155	160	165
tcc tgt aca tgc aac cct ggt ttc acc ctc aac gac gat gga agg tct			686
Ser Cys Thr Cys Asn Pro Gly Phe Thr Leu Asn Asp Asp Gly Arg Ser			
170	175	180	
tgc caa gat gtg aac gag tgc gaa act gag aat ccc tgt gtt cag acc			734
Cys Gln Asp Val Asn Glu Cys Glu Thr Glu Asn Pro Cys Val Gln Thr			
185	190	195	
tgt gtc aac acc tat ggc tct ttc atc tgc cgc tgt gac cca gga tat			782
Cys Val Asn Thr Tyr Gly Ser Phe Ile Cys Arg Cys Asp Pro Gly Tyr			
200	205	210	
gaa ctt gag gaa gat ggc att cac tgc agt gat atg gac gag tgc agc			830
Glu Leu Glu Glu Asp Gly Ile His Cys Ser Asp Met Asp Glu Cys Ser			
215	220	225	
ttc tcc gag ttc ctc tgt caa cac gag tgt gtg aac cag ccg ggc tca			878



Phe Ser Glu Phe Leu Cys Gln His Glu Cys Val Asn Gln Pro Gly Ser  
 230                      235                      240                      245  
 tac ttc tgc tgc tgc cct cca ggc tac gtc ctg ttg gat gat aac cga 926  
 Tyr Phe Cys Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Val Leu Leu Asp Asp Asn Arg  
                          250                      255                      260  
 agc tgc cag gat atc aat gaa tgt gag cac cga aac cac acg tgt acc 974  
 Ser Cys Gln Asp Ile Asn Glu Cys Glu His Arg Asn His Thr Cys Thr  
                          265                      270                      275  
 tca ctg cag act tgc tac aat cta caa ggg ggc ttc aaa tgt att gat 1022  
 Ser Leu Gln Thr Cys Tyr Asn Leu Gln Gly Gly Phe Lys Cys Ile Asp  
                          280                      285                      290  
 ccc atc agc tgt gag gag cct tat ctg ctg att ggt gaa aac cgc tgt 1070  
 Pro Ile Ser Cys Glu Glu Pro Tyr Leu Leu Ile Gly Glu Asn Arg Cys  
                          295                      300                      305  
 atg tgt cct gct gag cac acc agc tgc aga gac cag cca ttc acc atc 1118  
 Met Cys Pro Ala Glu His Thr Ser Cys Arg Asp Gln Pro Phe Thr Ile  
 310                      315                      320                      325  
 ctg tat cgg gac atg gat gtg gtg tca gga cgc tcc gtt cct gct gac 1166  
 Leu Tyr Arg Asp Met Asp Val Val Ser Gly Arg Ser Val Pro Ala Asp  
                          330                      335                      340  
 atc ttc cag atg caa gca aca acc cga tac cct ggt gcc tat tac att 1214  
 Ile Phe Gln Met Gln Ala Thr Thr Arg Tyr Pro Gly Ala Tyr Tyr Ile  
                          345                      350                      355  
 ttc cag atc aaa tct ggc aac gag ggt cga gag ttc tat atg cgg caa 1262  
 Phe Gln Ile Lys Ser Gly Asn Glu Gly Arg Glu Phe Tyr Met Arg Gln  
                          360                      365                      370





aca ggg cct atc agt gcc acc ctg gig atg aca cgc ccc atc aaa ggg 1310

Thr Gly Pro Ile Ser Ala Thr Leu Val Met Thr Arg Pro Ile Lys Gly

375

380

385

cct cgg gac atc cag ctg gac ttg gag atg atc act gtc aac act gtc 1358

Pro Arg Asp Ile Gln Leu Asp Leu Glu Met Ile Thr Val Asn Thr Val

390

395

400

405

atc aac ttc aga ggc agc tcc gtg atc cga ctg cgg ata tat gtg tgc 1406

Ile Asn Phe Arg Gly Ser Ser Val Ile Arg Leu Arg Ile Tyr Val Ser

410

415

420

cag tat ccg ttc tgagcctctg gctaaggcct ctgacactgc ctttcaccag 1458

Gln Tyr Pro Phe

425

caccgaggga cgggaggaga aaggaaacca gcaagaatga gagcgagaca gacattgcac 1518

ctttcctgct gaatatctcc tgggggcctc agcctagcat ctgacccat atctgtacta 1578

ttgcagatgg tcactctgaa ggacacctg ccttcagttc ctatgatgca gttatccaaa 1638

agtgttcctc ttagccctg atatgaggtt gccagtact ctcaaagcc ttccatttat 1698

ttccatcggt ttataaaaaa gaaaatagat tagatttgct ggggtatgag tccctgaagg 1758

ttcaaagac tgagtggcct gctctcacct ctctctctcc ttcttccatc tcttgctgca 1818

ttgtgcttt gcaaagctc tcatgggctc gtgggaaatg ctgggaatag ctagtgtgct 1878

tcttgcatgt tctgagaagg ctatgggaac acaccacagc aggatcgaag gtttttatag 1938

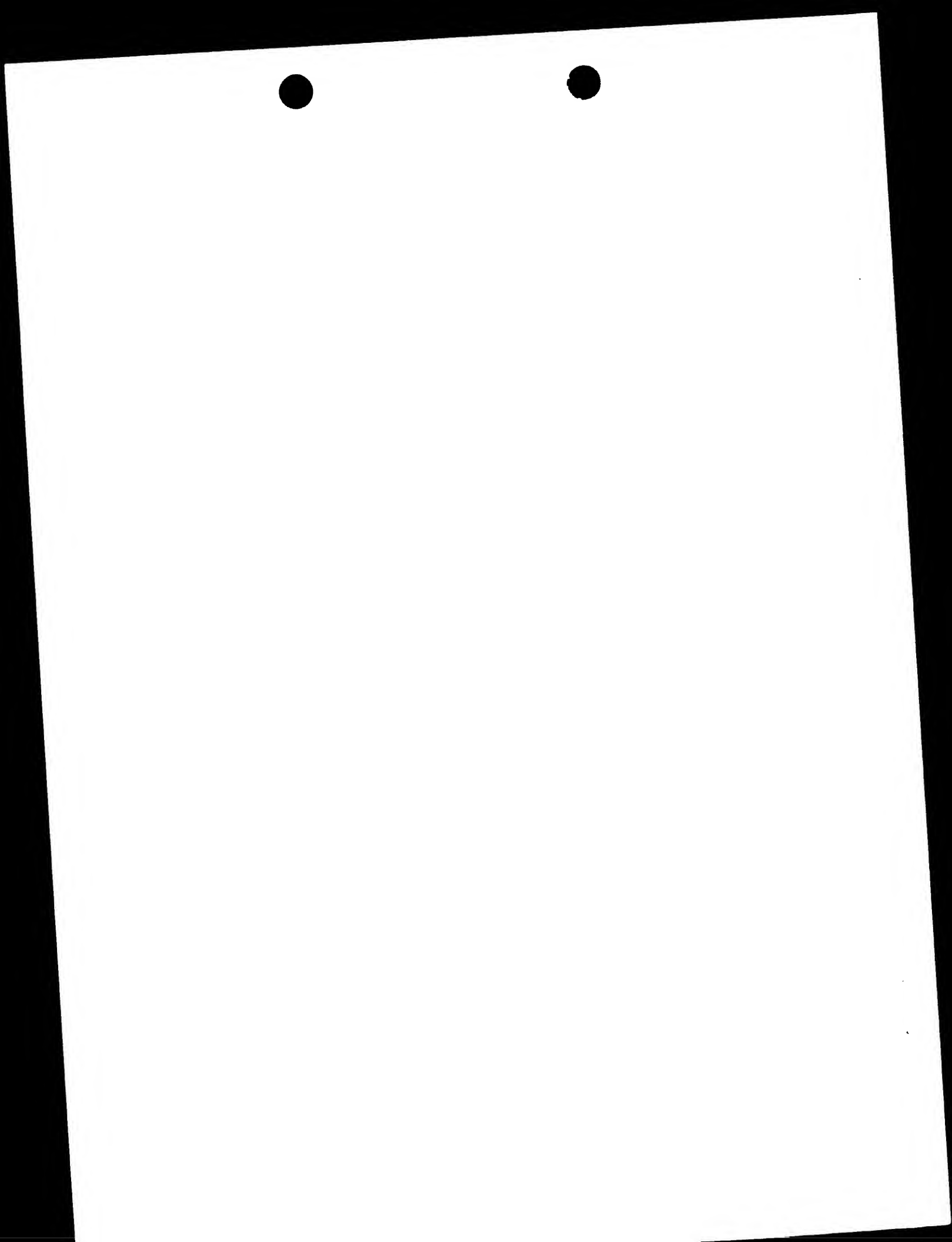
agctatttt aaaatcacat ctggtatttt cagcataaaa gaaatttag ttgtctttaa 1998

aatgtgatg agtgtttaac cttttcttat tcattttgag gcttctttaa gtggtagaat 2058

tccttccaaa ggctcagat acatgttatg tttagtcttt ccaacctcat cctttcctgc 2118

atcttagccc agtttttag aagacctctt aatcatgctt tttaaagagt ttltacccaa 2178

ctgcgttggg agacagaggt atccagactg attaaataat tgaagaaaaa aaaaa 2233



&lt;210&gt; 4

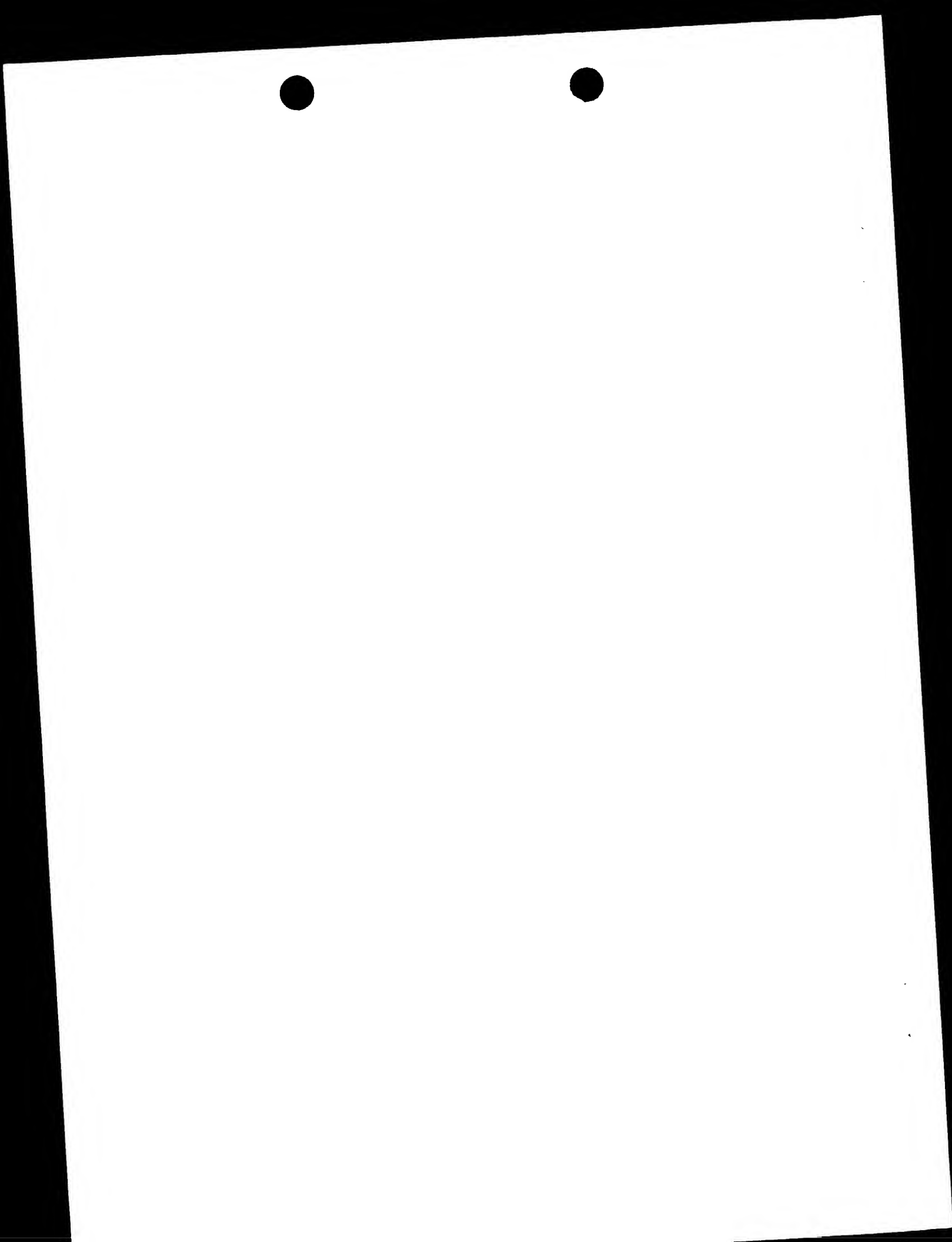
&lt;211&gt; 423

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 4

Gln Cys Thr Asn Gly Phe Asp Leu Asp Arg Gln Ser Gly Gln Cys Leu  
 1 5 10 15  
 Asp Ile Asp Glu Cys Arg Thr Ile Pro Glu Ala Cys Arg Gly Asp Met  
 20 25 30  
 Met Cys Val Asn Gln Asn Gly Gly Tyr Leu Cys Ile Pro Arg Thr Asn  
 35 40 45  
 Pro Val Tyr Arg Gly Pro Tyr Ser Asn Pro Tyr Ser Thr Ser Tyr Ser  
 50 55 60  
 Gly Pro Tyr Pro Ala Ala Ala Pro Pro Val Pro Ala Ser Asn Tyr Pro  
 65 70 75 80  
 Thr Ile Ser Arg Pro Leu Val Cys Arg Phe Gly Tyr Gln Met Asp Glu  
 85 90 95  
 Gly Asn Gln Cys Val Asp Val Asp Glu Cys Ala Thr Asp Ser His Gln  
 100 105 110  
 Cys Asn Pro Thr Gln Ile Cys Ile Asn Thr Glu Gly Gly Tyr Thr Cys  
 115 120 125  
 Ser Cys Thr Asp Gly Tyr Trp Leu Leu Glu Gly Gln Cys Leu Asp Ile  
 130 135 140  
 Asp Glu Cys Arg Tyr Gly Tyr Cys Gln Gln Leu Cys Ala Asn Val Pro



145	150	155	160
Gly Ser Tyr Ser Cys Thr Cys Asn Pro Gly Phe Thr Leu Asn Asp Asp			
	165	170	175
Gly Arg Ser Cys Gln Asp Val Asn Glu Cys Glu Thr Glu Asn Pro Cys			
	180	185	190
Val Gln Thr Cys Val Asn Thr Tyr Gly Ser Phe Ile Cys Arg Cys Asp			
	195	200	205
Pro Gly Tyr Glu Leu Glu Glu Asp Gly Ile His Cys Ser Asp Met Asp			
	210	215	220
Glu Cys Ser Phe Ser Glu Phe Leu Cys Gln His Glu Cys Val Asn Gln			
225	230	235	240
Pro Gly Ser Tyr Phe Cys Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Val Leu Leu Asp			
	245	250	255
Asp Asn Arg Ser Cys Gln Asp Ile Asn Glu Cys Glu His Arg Asn His			
	260	265	270
Thr Cys Thr Ser Leu Gln Thr Cys Tyr Asn Leu Gln Gly Gly Phe Lys			
	275	280	285
Cys Ile Asp Pro Ile Ser Cys Glu Glu Pro Tyr Leu Leu Ile Gly Glu			
	290	295	300
Asn Arg Cys Met Cys Pro Ala Glu His Thr Ser Cys Arg Asp Gln Pro			
305	310	315	320
Phe Thr Ile Leu Tyr Arg Asp Met Asp Val Val Ser Gly Arg Ser Val			
	325	330	335
Pro Ala Asp Ile Phe Gln Met Gln Ala Thr Thr Arg Tyr Pro Gly Ala			
	340	345	350
Tyr Tyr Ile Phe Gln Ile Lys Ser Gly Asn Glu Gly Arg Glu Phe Tyr			



355                                      360                                      365  
 Met Arg Gln Thr Gly Pro Ile Ser Ala Thr Leu Val Met Thr Arg Pro  
 370                                      375                                      380  
 Ile Lys Gly Pro Arg Asp Ile Gln Leu Asp Leu Glu Met Ile Thr Val  
 385                                      390                                      395                                      400  
 Asn Thr Val Ile Asn Phe Arg Gly Ser Ser Val Ile Arg Leu Arg Ile  
 405                                      410                                      415  
 Tyr Val Ser Gln Tyr Pro Phe  
 420

<210> 5

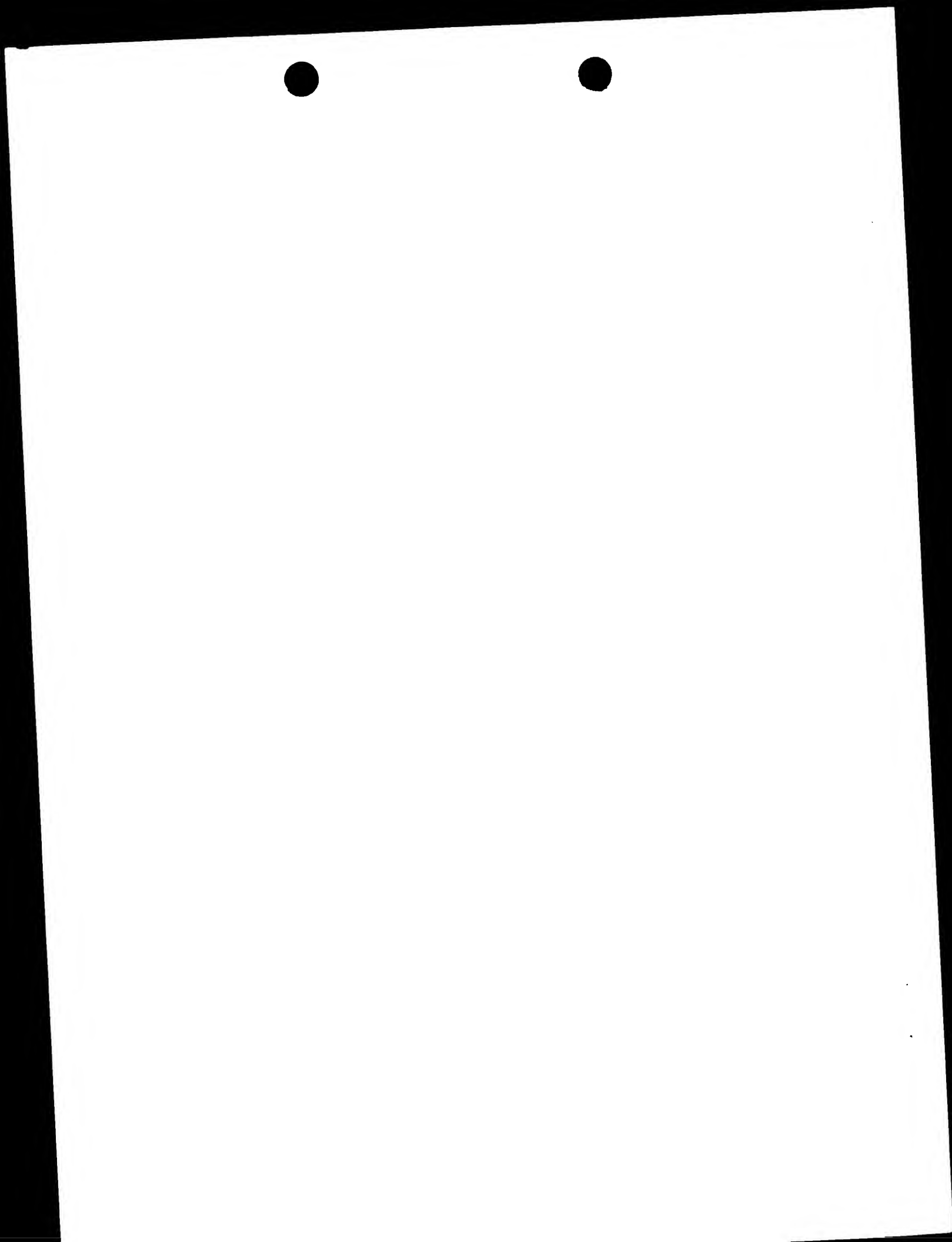
<211> 1269

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 5

cagtgcacaa acggcttga cctggaccgc cagtcaggac agtgtctaga tattgatgaa 60  
 tgccggacca tccctgaggc ttgtcgtggg gacatgatgt gtgtcaacca gaatggcggg 120  
 tatttgtgca tccctcgaac caaccagtg tatcgagggc ctactcaaa tccctactct 180  
 acatcctact caggcccaata cccagcagcg gcccaccag taccagcttc caactacccc 240  
 acgatttcaa ggctcttgt ctgccgcttt gggtatcaga tggatgaagg caaccagtgt 300  
 gtggatgigg acgagtgtgc aacagactca caccagtgc accctacca gatctgtatc 360  
 aacactgaag gaggttacac ctgtccttgc accgatgggt actggcttct ggaagggcag 420  
 tgcctagata ttgatgaatg tcgtatggt tactgccagc agctctgtgc aaatgttcca 480  
 ggatcctatt cctgtacatg caaccttgg ttcacctca acgacgatgg aaggtcttgc 540





caagatgtga acgagtgcga aactigagaat cccitgigtic agaccitgti caacacctat 600  
 ggcicittca tctgcegtg tgaccagga tatgaactig aggaagatgg caticactgc 660  
 agigataigg acgagtgcag ctctccgag ttcctctgtc aacacgagig tgtgaaccag 720  
 ccgggctcat actctgtct gtgcccctca ggctacgtcc tgttggaiga taaccgaagc 780  
 tgccaggata tcaatgaatg tgagcaccga aaccacacgt gtacctact gcagacttgc 840  
 tacaatctac aagggggctt caaatgtatt gatcccatca gctgtgagga gccttatctg 900  
 ctgattggig aaaaccgtg tatgtgtctt gctgagcaca ccagctgcag agaccagcca 960  
 ttccacctcc tgtatcggga catggaigtg gtgtcaggac gctccgttcc tgcigacatc 1020  
 ttccagatgc aagcaacaac ccgataccct gggtccattt acattttcca gatcaaatct 1080  
 ggcaacgagg gtcgagagtt ctatatgcgg caaacagggc ctatcagtc caccctggig 1140  
 atgacacgcc ccatcaaagg gccctgggac atccagctgg acttggagat gatcactgtc 1200  
 aacactgtca tcaacttcag aggcagctcc gtgatccgac tgcggatata tgtgtcgcag 1260  
 tatecgttc 1269

<210> 6

<211> 461

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Met Gly Pro Arg Ser Phe Glu Pro Met His Ser Gly Leu Cys Arg Gln

-35

-30

-25

Arg Arg Met Ile Leu Thr Val Thr Ile Leu Ala Leu Trp Leu Pro His

-20

-15

-10

-5

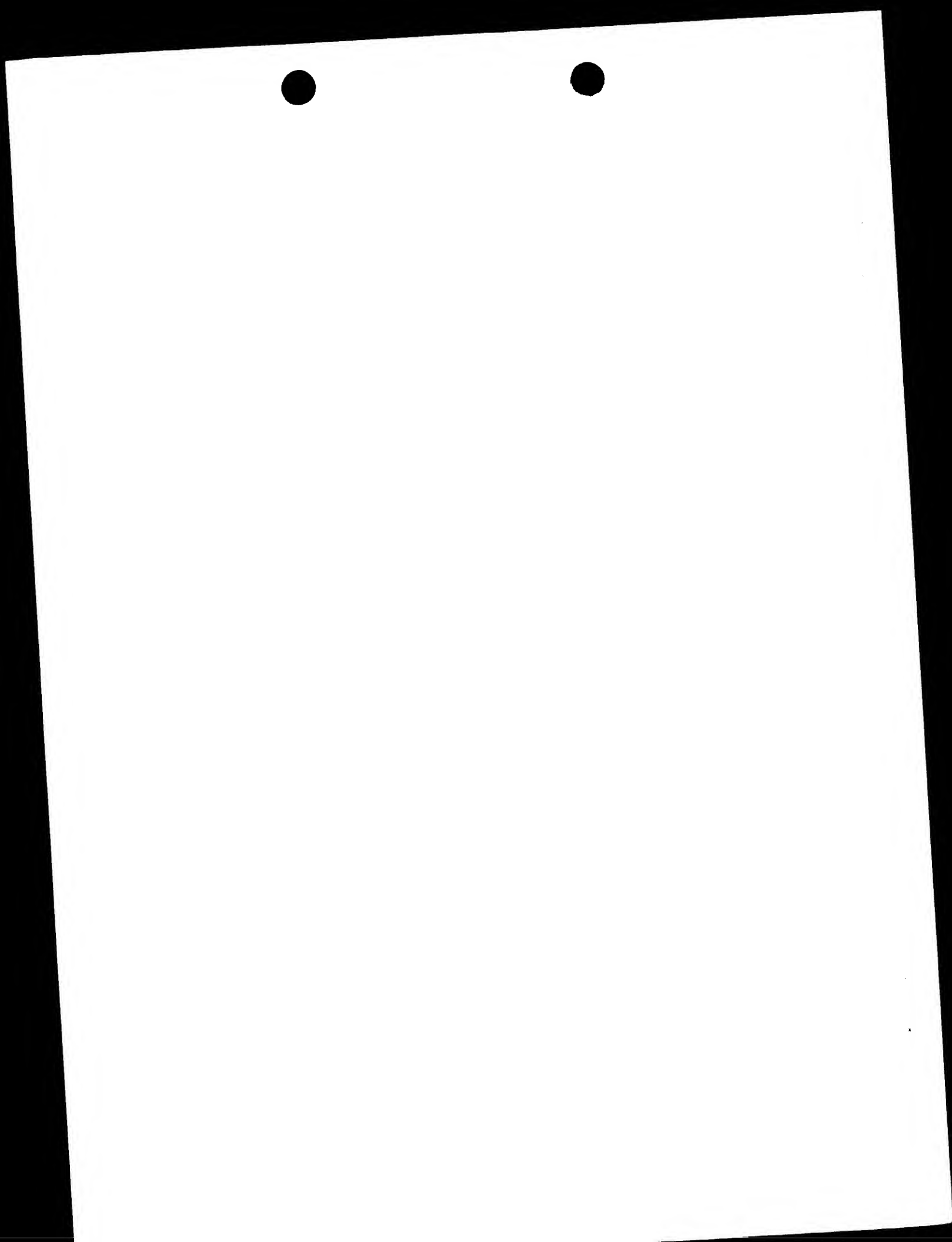
Pro Gly Asn Ala Gln Gln Gln Cys Thr Asn Gly Phe Asp Leu Asp Arg



	-1	1		5		10									
Gln	Ser	Gly	Gln	Cys	Leu	Asp	Ile	Asp	Glu	Cys	Arg	Thr	Ile	Pro	Glu
	15				20				25						
Ala	Cys	Arg	Gly	Asp	Met	Met	Cys	Val	Asn	Gln	Asn	Gly	Gly	Tyr	Leu
	30				35				40						
Cys	Ile	Pro	Arg	Thr	Asn	Pro	Val	Tyr	Arg	Gly	Pro	Tyr	Ser	Asn	Pro
	45				50				55					60	
Tyr	Ser	Thr	Ser	Tyr	Ser	Gly	Pro	Tyr	Pro	Ala	Ala	Ala	Pro	Pro	Val
			65					70						75	
Pro	Ala	Ser	Asn	Tyr	Pro	Thr	Ile	Ser	Arg	Pro	Leu	Val	Cys	Arg	Phe
		80						85						90	
Gly	Tyr	Gln	Met	Asp	Glu	Gly	Asn	Gln	Cys	Val	Asp	Val	Asp	Glu	Cys
		95					100							105	
Ala	Thr	Asp	Ser	His	Gln	Cys	Asn	Pro	Thr	Gln	Ile	Cys	Ile	Asn	Thr
		110					115							120	
Glu	Gly	Gly	Tyr	Thr	Cys	Ser	Cys	Thr	Asp	Gly	Tyr	Trp	Leu	Leu	Glu
	125					130				135				140	
Gly	Gln	Cys	Leu	Asp	Ile	Asp	Glu	Cys	Arg	Tyr	Gly	Tyr	Cys	Gln	Gln
			145						150					155	
Leu	Cys	Ala	Asn	Val	Pro	Gly	Ser	Tyr	Ser	Cys	Thr	Cys	Asn	Pro	Gly
		160							165					170	
Phe	Thr	Leu	Asn	Asp	Asp	Gly	Arg	Ser	Cys	Gln	Asp	Val	Asn	Glu	Cys
		175							180					185	
Glu	Thr	Glu	Asn	Pro	Cys	Val	Gln	Thr	Cys	Val	Asn	Thr	Tyr	Gly	Ser
		190							195					200	
Phe	Ile	Cys	Arg	Cys	Asp	Pro	Gly	Tyr	Glu	Leu	Glu	Glu	Asp	Gly	Ile



205	210	215	220
His Cys Ser Asp Met Asp Glu Cys Ser Phe Ser Glu Phe Leu Cys Gln			
225	230	235	
His Glu Cys Val Asn Gln Pro Gly Ser Tyr Phe Cys Ser Cys Pro Pro			
240	245	250	
Gly Tyr Val Leu Leu Asp Asp Asn Arg Ser Cys Gln Asp Ile Asn Glu			
255	260	265	
Cys Glu His Arg Asn His Thr Cys Thr Ser Leu Gln Thr Cys Tyr Asn			
270	275	280	
Leu Gln Gly Gly Phe Lys Cys Ile Asp Pro Ile Ser Cys Glu Glu Pro			
285	290	295	300
Tyr Leu Leu Ile Gly Glu Asn Arg Cys Met Cys Pro Ala Glu His Thr			
305	310	315	
Ser Cys Arg Asp Gln Pro Phe Thr Ile Leu Tyr Arg Asp Met Asp Val			
320	325	330	
Val Ser Gly Arg Ser Val Pro Ala Asp Ile Phe Gln Met Gln Ala Thr			
335	340	345	
Thr Arg Tyr Pro Gly Ala Tyr Tyr Ile Phe Gln Ile Lys Ser Gly Asn			
350	355	360	
Glu Gly Arg Glu Phe Tyr Met Arg Gln Thr Gly Pro Ile Ser Ala Thr			
365	370	375	380
Leu Val Met Thr Arg Pro Ile Lys Gly Pro Arg Asp Ile Gln Leu Asp			
385	390	395	
Leu Glu Met Ile Thr Val Asn Thr Val Ile Asn Phe Arg Gly Ser Ser			
400	405	410	
Val Ile Arg Leu Arg Ile Tyr Val Ser Gln Tyr Pro Phe			



415

420

425

&lt;210&gt; 7

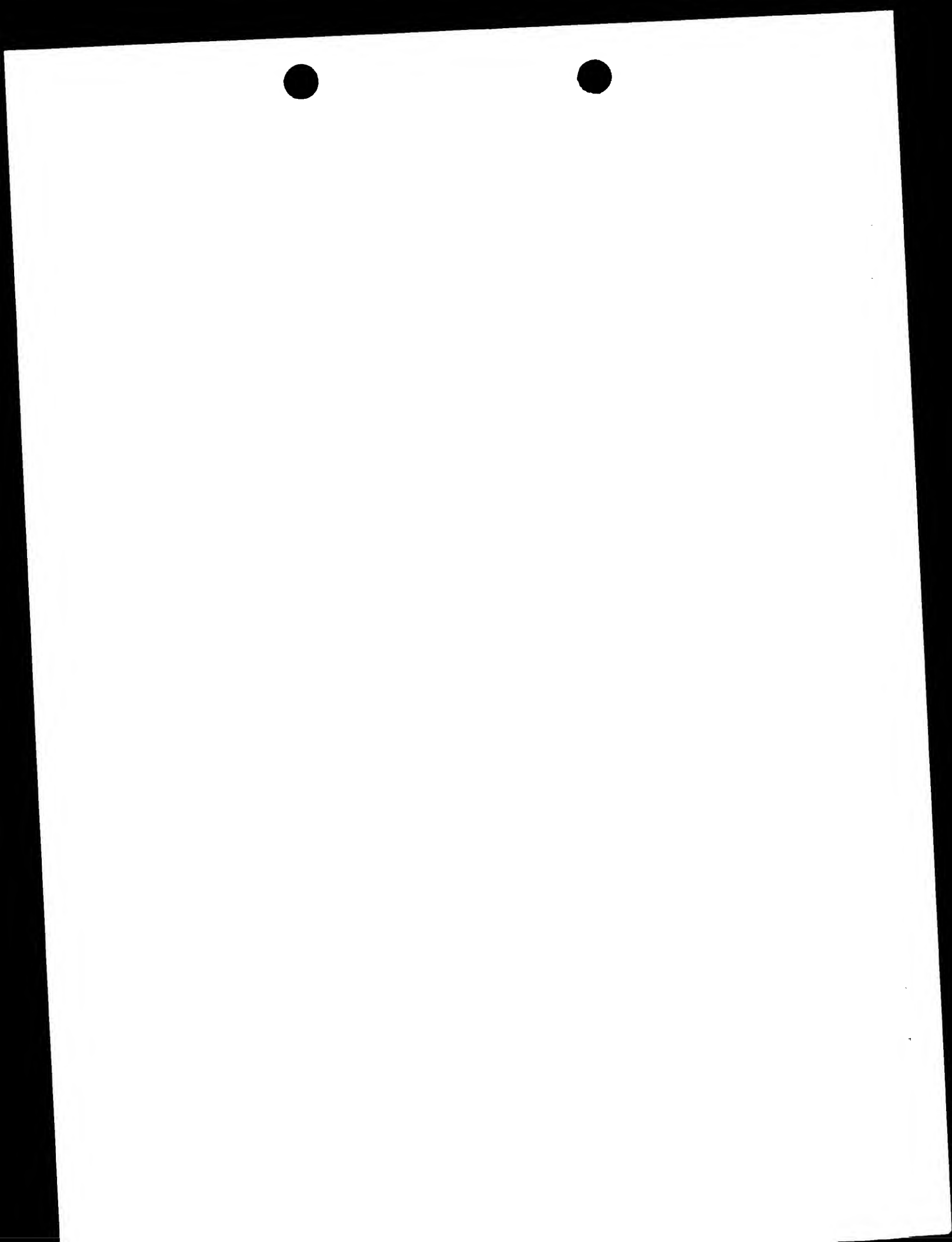
&lt;211&gt; 1383

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 7

atgggacctt gaagtcttga gccaatgcac agtggactct gcagacagag acgcatgata 60  
ctcactgtta ccatcttggc actctggcct ccacatccctg ggaatgcaca gcagcagtgc 120  
acaaacggct ttgacctgga ccgccagttc ggacagtgic tagatatga tgaatgccgg 180  
accatccctg aggcctgtgc tggggacatg atgtgtgtca accagaatgg cgggtatttg 240  
tgcatccctc gaaccaaccc agtgtatcga gggccctact caaatcccta ctctacatcc 300  
tactcaggcc cataccagc agcggcccca ccagttaccag ctccaacta cccacgatt 360  
tcaaggccct ttgtctgccg ctttgggtat cagatggatg aaggcaacca gtgtgtggat 420  
gtggacgagt gtgcaacaga ctacaccag tgcaacccta cccagatctg tatcaacact 480  
gaaggagggt acacctgtc ctgcaccgat gggtactggc ttctggaagg gcagtgccta 540  
gatatgtatg aatgtccta tggttactgc cagcagctct gtgcaaatgt tccaggatcc 600  
tattcctgta catgcaaccc tggtttacc ctcaacgacg atggaaggic ttgccaagat 660  
gtgaacgagt gcgaaactga gaatccctgt gtacagacct gtgtcaacac ctatggctct 720  
ttcatctgcc gctgtgacct aggatatga cttaggaag atggcatcca ctgcagtgat 780  
atggacgagt gcagcttctc cgagttctc tgtcaacacg agtgtgtgaa ccagccgggc 840  
tcatacttct gctctgtccc tccaggttac gtctgttgg atgataaccg aagctgccag 900  
gatatcaatg aatgtgagca ccgaaaccac acgtgtacct cactgcagac ttgttacaat 960  
ctacaagggg gcttcaaatg tatgatccc atcagctgtg aggagcctta tctgtgatt 1020





ggtgaaaacc gctgtatgtg tctgtgtgag cacaccagct gcagagacca gccattcacc 1080  
atcctgtatc gggacatgga tgtggtgtca ggacgtccg ttcctgtga catctccag 1140  
atgcaagcaa caaccgata ccttggtgcc tattacattt tccagatcaa atciggcaac 1200  
gagggtcgag agttctatat gcggcaaaca gggcctatca gtgccaccci ggtagagaca 1260  
cgccccatca aagggcctcg ggacatccag ctggacttgg agatgatcac tgtcaacact 1320  
gtcatcaact tcagaggcag ctccgtgatc cgactgcgga tataatgtgtc gcagiatccg 1380  
ttc 1383

<210> 8

<211> 2429

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<223> Clone mouse A55b derived from Day 13 mouse embryonic heart

<220>

<221> CDS

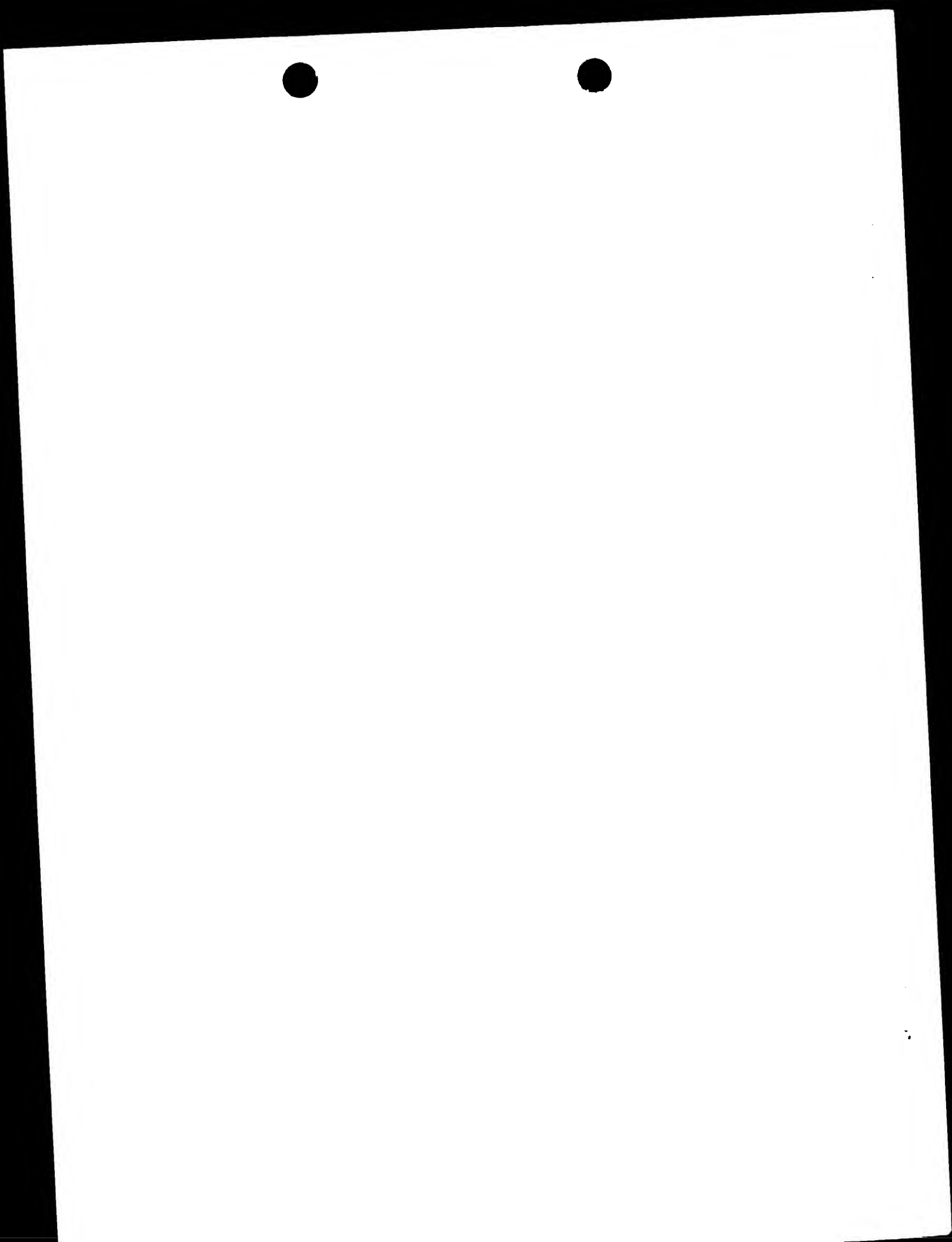
<222> (232).. (1614)

<220>

<221> sig\_peptide

<222> (232).. (339)

<220>



<221> mat\_peptide

<222> (340).. (1614)

<400> 8

cagcatctcg agagaggcag cagacaacct ctctaggtea ttctctttc tttttggaaa 60  
 gggcagcaac gttgtgcgca gtttataaaa tctcacacta catgttttt aaatttggga 120  
 gactgctgac tacggcacca gcaattgcct tgcctgcgacg gctgtgagac aagcagaagt 180  
 ctccgaacac ttctgtctgc gtttgcctta tgtgtgtgat ttacagaggg a atg gga 237

Met Gly

-35

cct aga agt ttc gag cca atg cac agt gga ctc tgc aga cag aga cgc 285  
 Pro Arg Ser Phe Glu Pro Met His Ser Gly Leu Cys Arg Gln Arg Arg

-30

-25

-20

atg ata ctc act gtt acc atc ttg gca ctc tgg ctt cca cat cct ggg 333  
 Met Ile Leu Thr Val Thr Ile Leu Ala Leu Trp Leu Pro His Pro Gly

-15

-10

-5

aat gca cag cag cag tgc aca aac ggc ttt gac ctg gac cgc cag tca 381  
 Asn Ala Gln Gln Gln Cys Thr Asn Gly Phe Asp Leu Asp Arg Gln Ser

-1 1

5

10

gga cag tgt cta gat att gat gaa tgc cgg acc atc cct gag gct tgt 429  
 Gly Gln Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Thr Ile Pro Glu Ala Cys

15

20

25

30

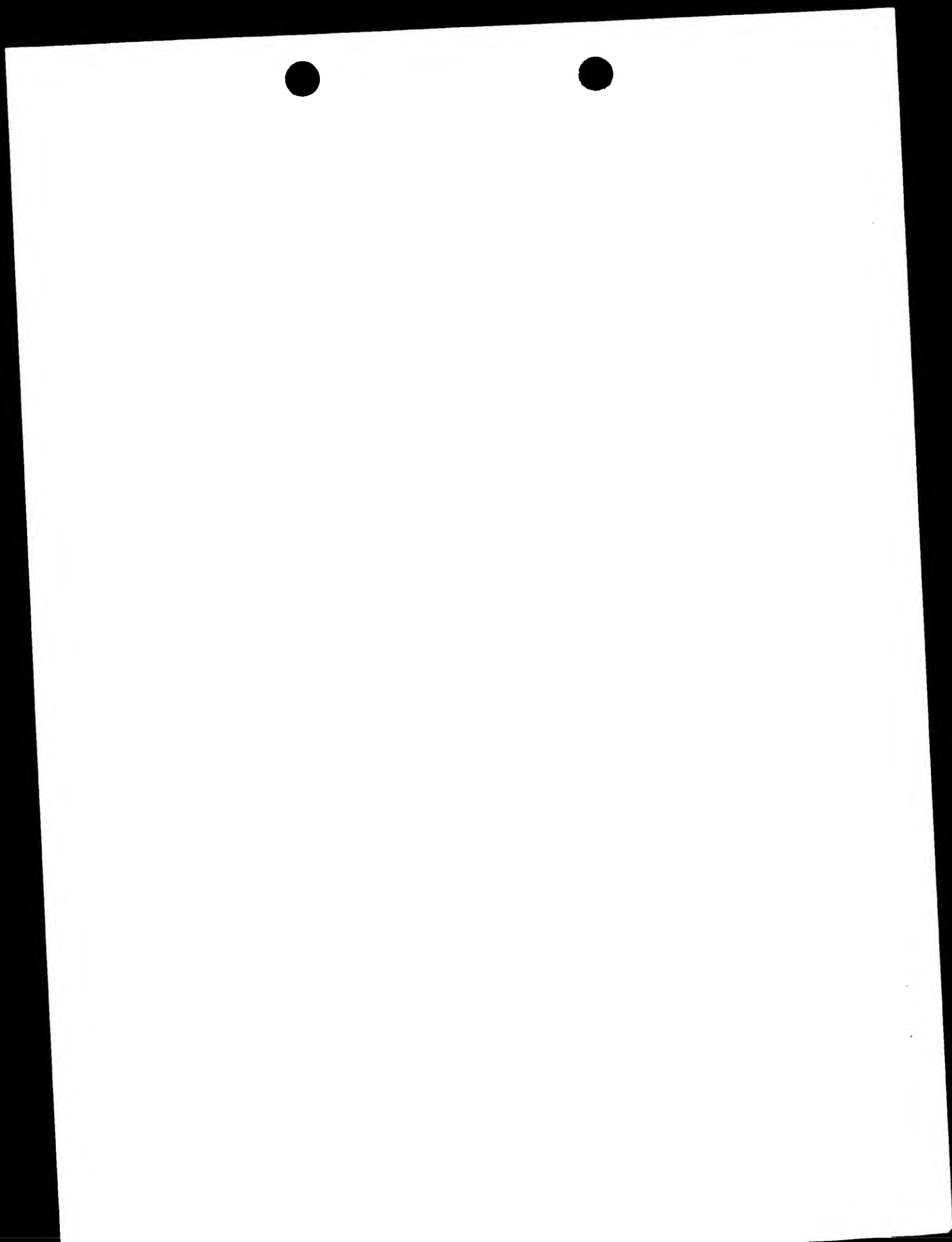
cgt ggg gac atg atg tgt gtc aac cag aat ggc ggg tat ttg tgc atc 477  
 Arg Gly Asp Met Met Cys Val Asn Gln Asn Gly Gly Tyr Leu Cys Ile

35

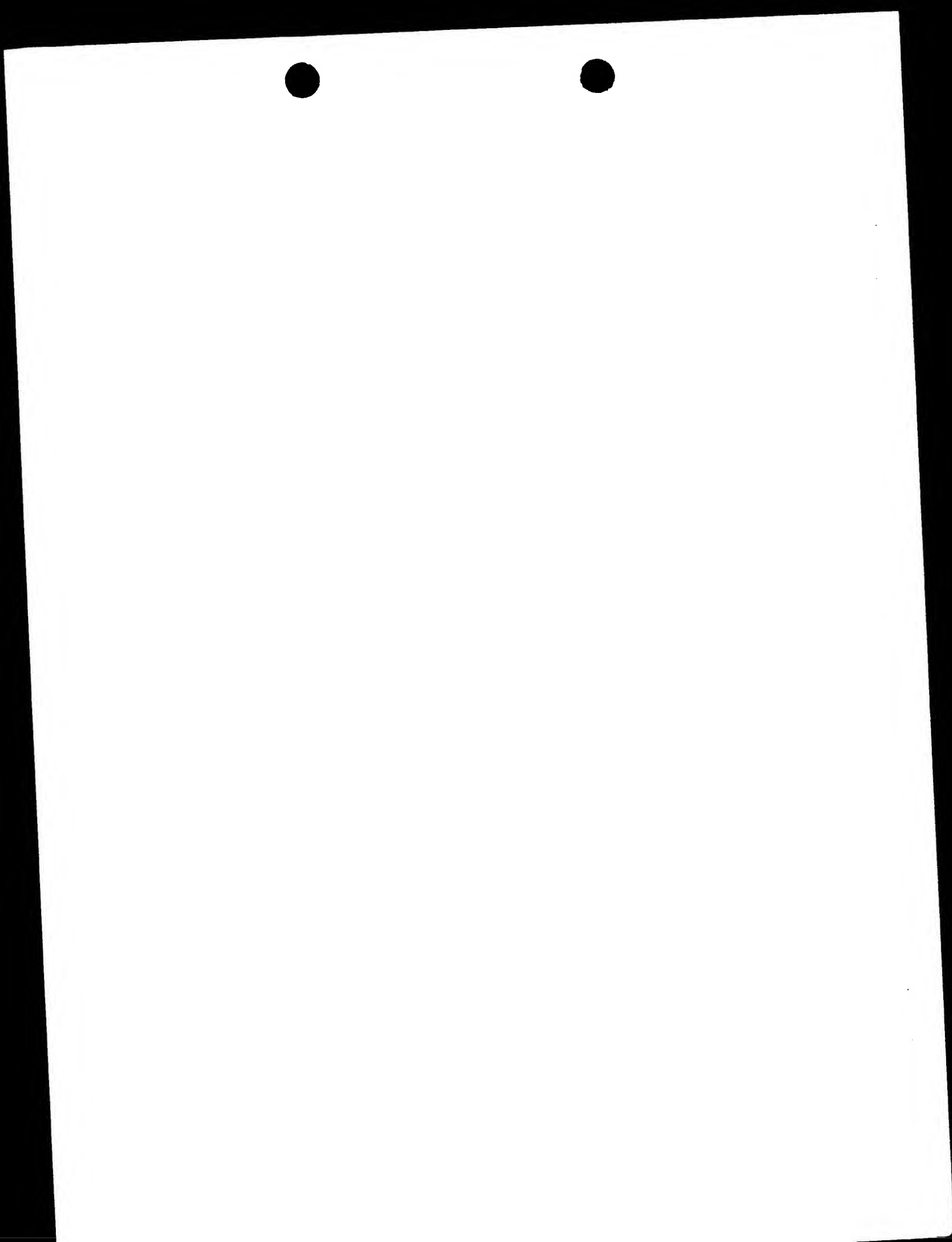
40

45

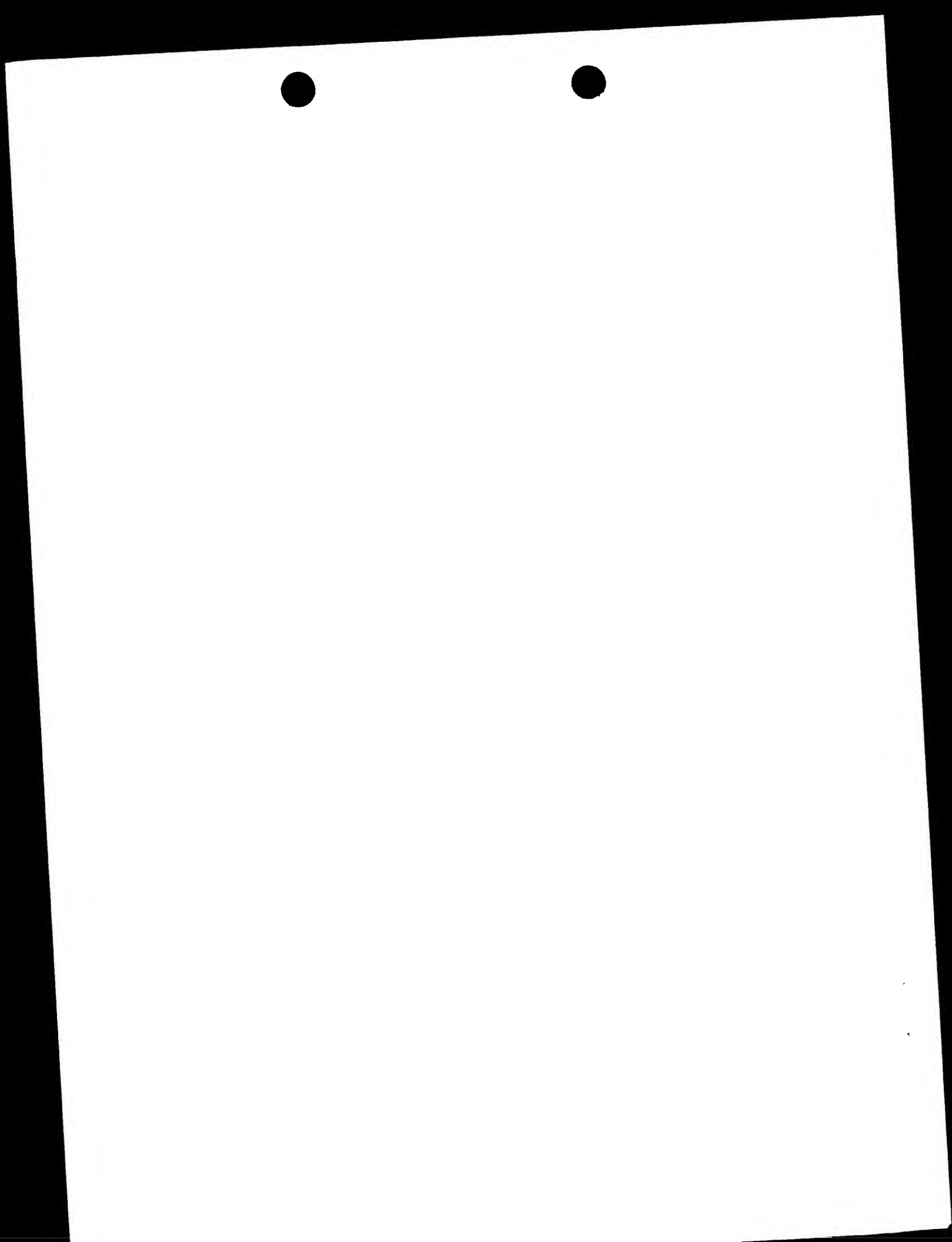
cct cga acc aac cca gtg tat cga ggg cct tac tca aat ccc tac tct 525



Pro Arg Thr Asn Pro Val Tyr Arg Gly Pro Tyr Ser Asn Pro Tyr Ser  
                   50                  55                  60  
 aca tcc tac tca ggc cca tac cca gca gcg gcc cca cca gta cca gct 573  
 Thr Ser Tyr Ser Gly Pro Tyr Pro Ala Ala Ala Pro Pro Val Pro Ala  
                   65                  70                  75  
 tcc aac tac ccc acg att tca agg cct ctt gtc tgc cgc ttt ggg tat 621  
 Ser Asn Tyr Pro Thr Ile Ser Arg Pro Leu Val Cys Arg Phe Gly Tyr  
                   80                  85                  90  
 cag atg gat gaa ggc aac cag tgt gtg gat gtg gac gag tgt gca aca 669  
 Gln Met Asp Glu Gly Asn Gln Cys Val Asp Val Asp Glu Cys Ala Thr  
                   95                  100                  105                  110  
 gac tca cac cag tgc aac cct acc cag atc tgt atc aac act gaa gga 717  
 Asp Ser His Gln Cys Asn Pro Thr Gln Ile Cys Ile Asn Thr Glu Gly  
                   115                  120                  125  
 ggt tac acc tgc tcc tgc acc gat ggg tac tgg ctt ctg gaa ggg cag 765  
 Gly Tyr Thr Cys Ser Cys Thr Asp Gly Tyr Trp Leu Leu Glu Gly Gln  
                   130                  135                  140  
 tgc cta gat att gat gaa tgt cgc tat ggt tac tgc cag cag ctc tgt 813  
 Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Tyr Gly Tyr Cys Gln Gln Leu Cys  
                   145                  150                  155  
 gca aat gtt cca gga tcc tat tcc tgt aca tgc aac cct ggt ttc acc 861  
 Ala Asn Val Pro Gly Ser Tyr Ser Cys Thr Cys Asn Pro Gly Phe Thr  
                   160                  165                  170  
 ctc aac gac gat gga agg tct tgc caa gat gtg aac gag tgc gaa act 909  
 Leu Asn Asp Asp Gly Arg Ser Cys Gln Asp Val Asn Glu Cys Glu Thr  
                   175                  180                  185                  190

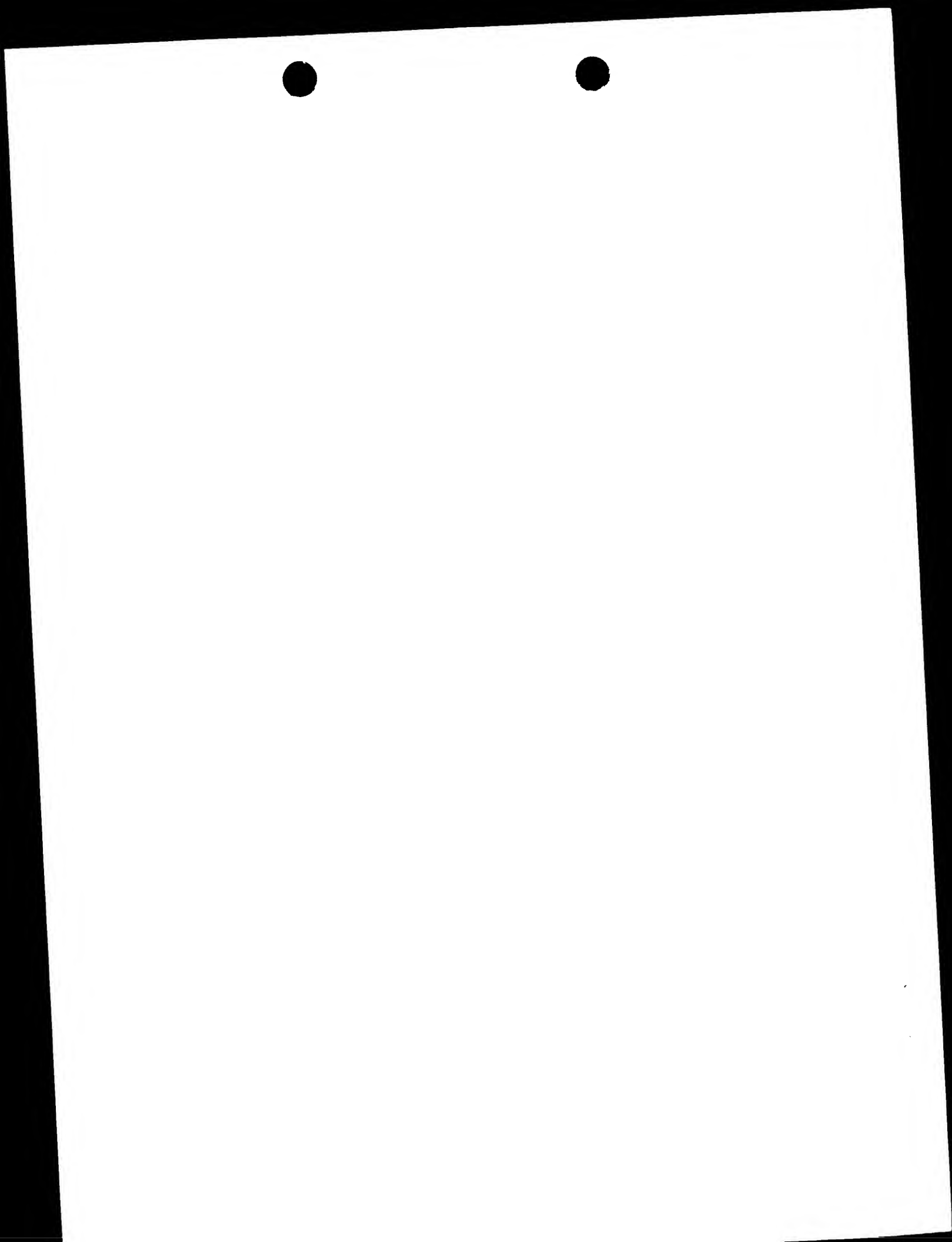


gag aat ccc tgt gtt cag acc tgt gtc aac acc tat ggc tct ttc atc 957  
 Glu Asn Pro Cys Val Gln Thr Cys Val Asn Thr Tyr Gly Ser Phe Ile  
 195 200 205  
 tgc cgc tgt gac cca gga tat gaa ctt gag gaa gat ggc att cac tgc 1005  
 Cys Arg Cys Asp Pro Gly Tyr Glu Leu Glu Glu Asp Gly Ile His Cys  
 210 215 220  
 agt gat atg gac gag tgc agc ttc tcc gag ttc ctc tgt caa cac gag 1053  
 Ser Asp Met Asp Glu Cys Ser Phe Ser Glu Phe Leu Cys Gln His Glu  
 225 230 235  
 tgt gtg aac cag ccg ggc tca tac ttc tgc tgc tgc cct cca ggc tac 1101  
 Cys Val Asn Gln Pro Gly Ser Tyr Phe Cys Ser Cys Pro Pro Gly Tyr  
 240 245 250  
 gtc ctg ttg gat gat aac cga agc tgc cag gat atc aat gaa tgt gag 1149  
 Val Leu Leu Asp Asp Asn Arg Ser Cys Gln Asp Ile Asn Glu Cys Glu  
 255 260 265 270  
 cac cga aac cac acg tgt acc tca ctg cag act tgc tac aat cta caa 1197  
 His Arg Asn His Thr Cys Thr Ser Leu Gln Thr Cys Tyr Asn Leu Gln  
 275 280 285  
 ggg ggc ttc aaa tgt att gat ccc atc agc tgt gag gag cct tat ctg 1245  
 Gly Gly Phe Lys Cys Ile Asp Pro Ile Ser Cys Glu Glu Pro Tyr Leu  
 290 295 300  
 ctg att ggt gaa aac cgc tgt atg tgt cct gct gag cac acc agc tgc 1293  
 Leu Ile Gly Glu Asn Arg Cys Met Cys Pro Ala Glu His Thr Ser Cys  
 305 310 315  
 aga gac cag cca ttc acc atc ctg tat cgg gac atg gat gtg gtg tca 1341  
 Arg Asp Gln Pro Phe Thr Ile Leu Tyr Arg Asp Met Asp Val Val Ser





320 325 330  
gga cgc tcc gtt cct gct gac atc ttc cag atg caa gca aca acc cga 1389  
Gly Arg Ser Val Pro Ala Asp Ile Phe Gln Met Gln Ala Thr Thr Arg  
335 340 345 350  
tac cct ggt gcc tat tac att ttc cag atc aaa tct ggc aac gag ggt 1437  
Tyr Pro Gly Ala Tyr Tyr Ile Phe Gln Ile Lys Ser Gly Asn Glu Gly  
355 360 365  
cga gag ttc tat atg cgg caa aca ggg cct atc agt gcc acc ctg gtg 1485  
Arg Glu Phe Tyr Met Arg Gln Thr Gly Pro Ile Ser Ala Thr Leu Val  
370 375 380  
atg aca cgc ccc atc aaa ggg cct cgg gac atc cag ctg gac ttg gag 1533  
Met Thr Arg Pro Ile Lys Gly Pro Arg Asp Ile Gln Leu Asp Leu Glu  
385 390 395  
atg atc act gtc aac act gtc atc aac ttc aga ggc agc tcc gtg atc 1581  
Met Ile Thr Val Asn Thr Val Ile Asn Phe Arg Gly Ser Ser Val Ile  
400 405 410  
cga ctg cgg ata tat gtg tgg cag tat ccg ttc tgagcctctg gctaaggcct 1634  
Arg Leu Arg Ile Tyr Val Ser Gln Tyr Pro Phe  
415 420 425  
ctgacactgc ctttaccag caccgaggga cgggaggaga aaggaaacca gcaagaatga 1694  
gagcgagaca gacattgcac ctttctgtct gaatatctcc tgggggcatc agcctagcat 1754  
cttgacccat atctgtacta ttgcagatgg tcactctgaa ggacaccctg ccttcagttc 1814  
ctatgatgca gttatccaaa agtgttccatc ttagcccccig atatgaggtt gccagtgaat 1874  
cttcaaagcc ttccatttat ttccatcggt ttataaaaaa gaaaatagat tagatttgct 1934  
ggggatgag tcttcgaagg ttcaaaagac tgagtggcct gctctcaccct cttctctctc 1994  
ttctccatc tcttgctgca ttgtctgttt gcaaaagctc tcatgggcct gtgggaaatg 2054



ctgggaatag ctatgttgc tcttgcatgt tctgagaagg ctatgggaac acaccacagc 2114  
 aggategaag gtittiatag agtctatitt aaaatcacat ctggtatitt cagcataaaa 2174  
 gaaatttiag ttgtctttaa aatttgtatg agigtittaac cttttcttat tcatittgag 2234  
 gctttcttaa giggtagaat tcttccaaa ggcttcagat acatgttatg ttcagtcctt 2294  
 ccaacctcat cctttctgc atcttagccc agtttttacg aagacctctt aatcatgctt 2354  
 tnttaagagt ttttacccaa ctgcgttgga agacagaggt atccagactg attaaataat 2414  
 tgaagaaaaa aaaaa 2429

<210> 9

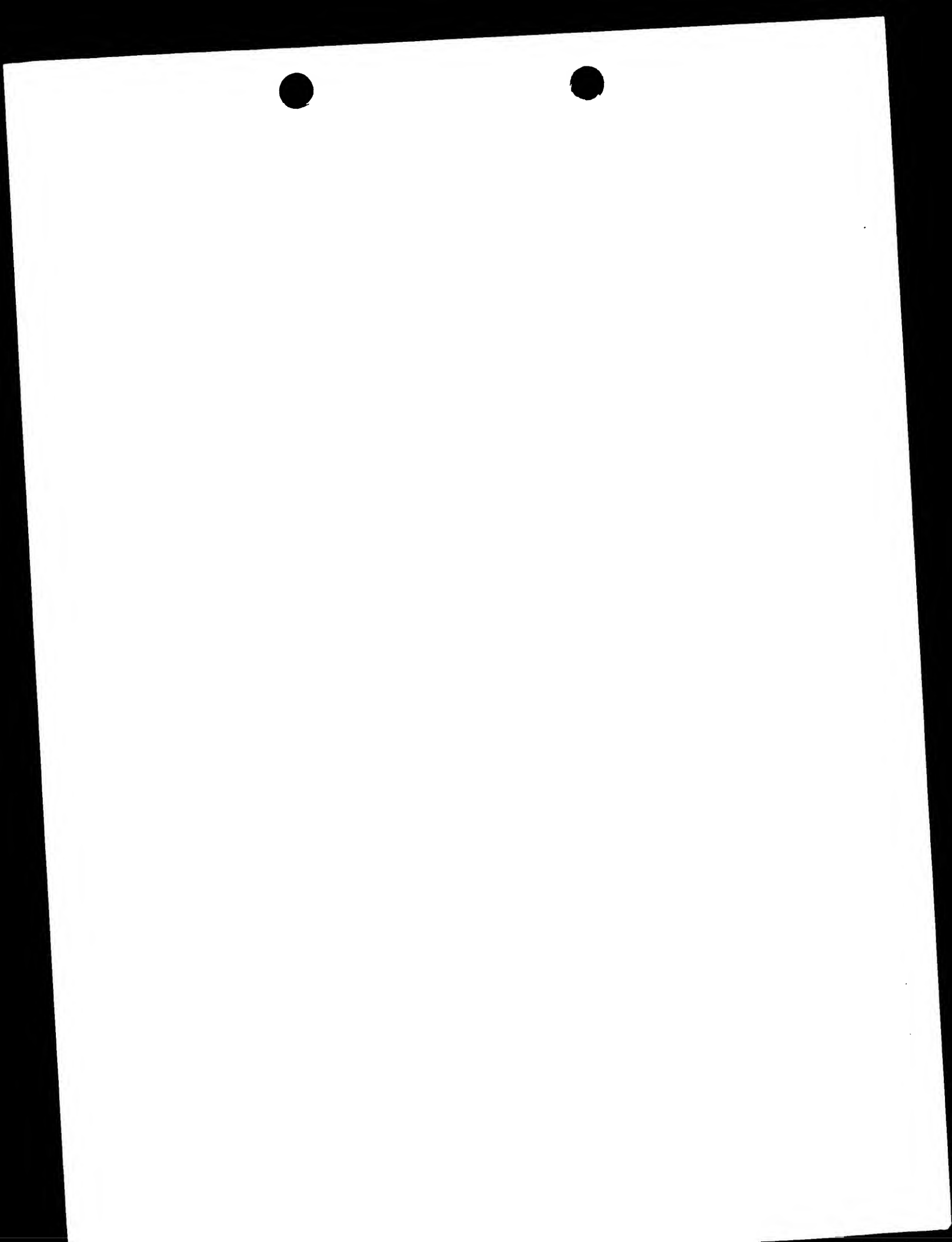
<211> 423

<212> PRT

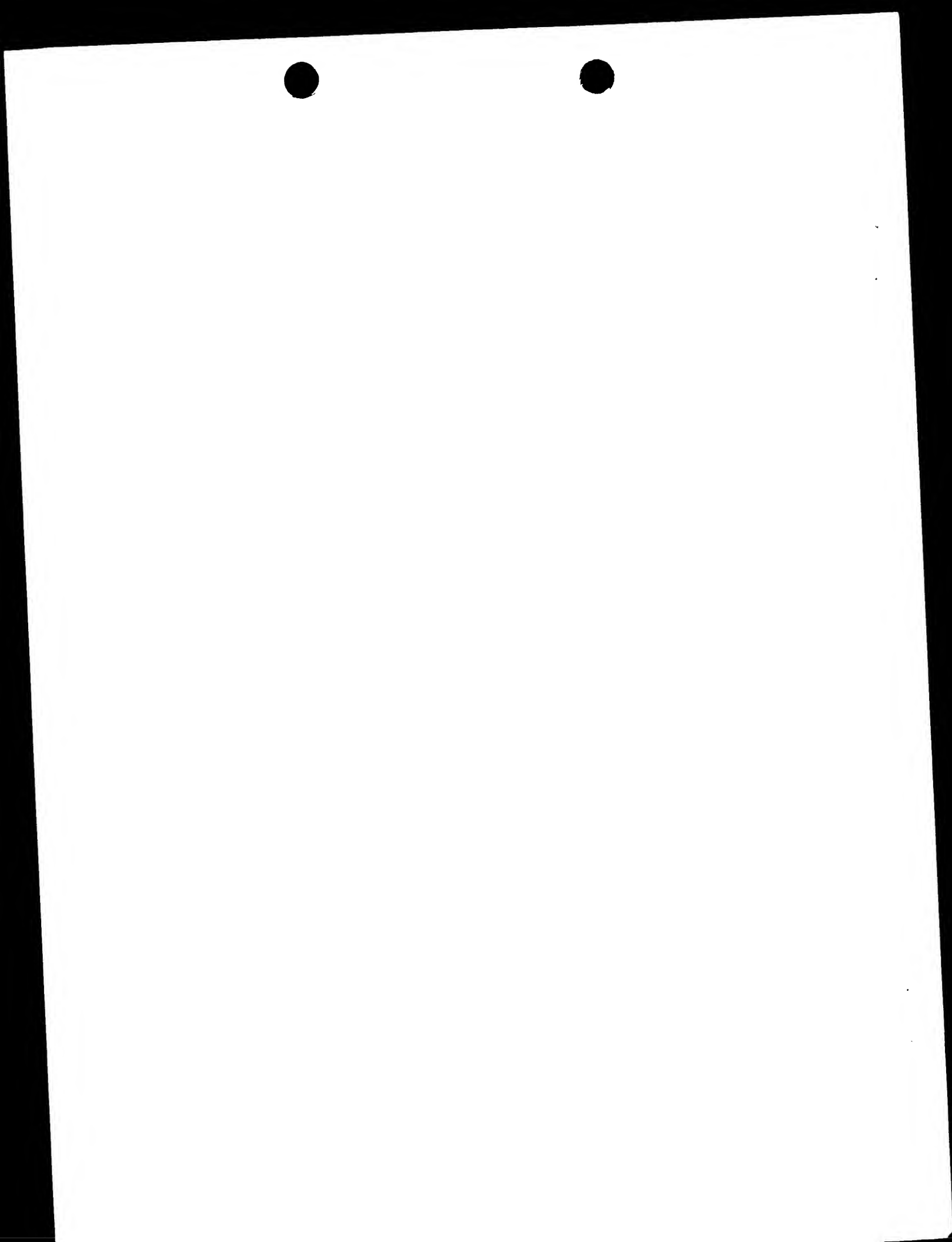
<213> Mus musculus

<400> 9

Gln	Cys	Thr	Asn	Gly	Phe	Asp	Leu	Asp	Arg	Gln	Ser	Gly	Gln	Cys	Leu
1				5					10					15	
Asp	Ile	Asp	Glu	Cys	Arg	Thr	Ile	Pro	Glu	Ala	Cys	Arg	Gly	Asp	Met
			20						25					30	
Met	Cys	Val	Asn	Gln	Asn	Gly	Gly	Tyr	Leu	Cys	Ile	Pro	Arg	Thr	Asn
			35					40						45	
Pro	Val	Tyr	Arg	Gly	Pro	Tyr	Ser	Asn	Pro	Tyr	Ser	Thr	Ser	Tyr	Ser
			50					55						60	
Gly	Pro	Tyr	Pro	Ala	Ala	Ala	Pro	Pro	Val	Pro	Ala	Ser	Asn	Tyr	Pro
			65					70						75	
Thr	Ile	Ser	Arg	Pro	Leu	Val	Cys	Arg	Phe	Gly	Tyr	Gln	Met	Asp	Glu



	85	90	95
Gly Asn Gln Cys Val Asp Val Asp Glu Cys Ala Thr Asp Ser His Gln			
100	105	110	
Cys Asn Pro Thr Gln Ile Cys Ile Asn Thr Glu Gly Gly Tyr Thr Cys			
115	120	125	
Ser Cys Thr Asp Gly Tyr Trp Leu Leu Glu Gly Gln Cys Leu Asp Ile			
130	135	140	
Asp Glu Cys Arg Tyr Gly Tyr Cys Gln Gln Leu Cys Ala Asn Val Pro			
145	150	155	160
Gly Ser Tyr Ser Cys Thr Cys Asn Pro Gly Phe Thr Leu Asn Asp Asp			
165	170	175	
Gly Arg Ser Cys Gln Asp Val Asn Glu Cys Glu Thr Glu Asn Pro Cys			
180	185	190	
Val Gln Thr Cys Val Asn Thr Tyr Gly Ser Phe Ile Cys Arg Cys Asp			
195	200	205	
Pro Gly Tyr Glu Leu Glu Glu Asp Gly Ile His Cys Ser Asp Met Asp			
210	215	220	
Glu Cys Ser Phe Ser Glu Phe Leu Cys Gln His Glu Cys Val Asn Gln			
225	230	235	240
Pro Gly Ser Tyr Phe Cys Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Val Leu Leu Asp			
245	250	255	
Asp Asn Arg Ser Cys Gln Asp Ile Asn Glu Cys Glu His Arg Asn His			
260	265	270	
Thr Cys Thr Ser Leu Gln Thr Cys Tyr Asn Leu Gln Gly Gly Phe Lys			
275	280	285	
Cys Ile Asp Pro Ile Ser Cys Glu Glu Pro Tyr Leu Leu Ile Gly Glu			



290	295	300	
Asn Arg Cys Met Cys Pro Ala Glu His Thr Ser Cys Arg Asp Gln Pro			
305	310	315	320
Phe Thr Ile Leu Tyr Arg Asp Met Asp Val Val Ser Gly Arg Ser Val			
	325	330	335
Pro Ala Asp Ile Phe Gln Met Gln Ala Thr Thr Arg Tyr Pro Gly Ala			
	340	345	350
Tyr Tyr Ile Phe Gln Ile Lys Ser Gly Asn Glu Gly Arg Glu Phe Tyr			
	355	360	365
Met Arg Gln Thr Gly Pro Ile Ser Ala Thr Leu Val Met Thr Arg Pro			
	370	375	380
Ile Lys Gly Pro Arg Asp Ile Gln Leu Asp Leu Glu Met Ile Thr Val			
385	390	395	400
Asn Thr Val Ile Asn Phe Arg Gly Ser Ser Val Ile Arg Leu Arg Ile			
	405	410	415
Tyr Val Ser Gln Tyr Pro Phe			
	420		

&lt;210&gt; 10

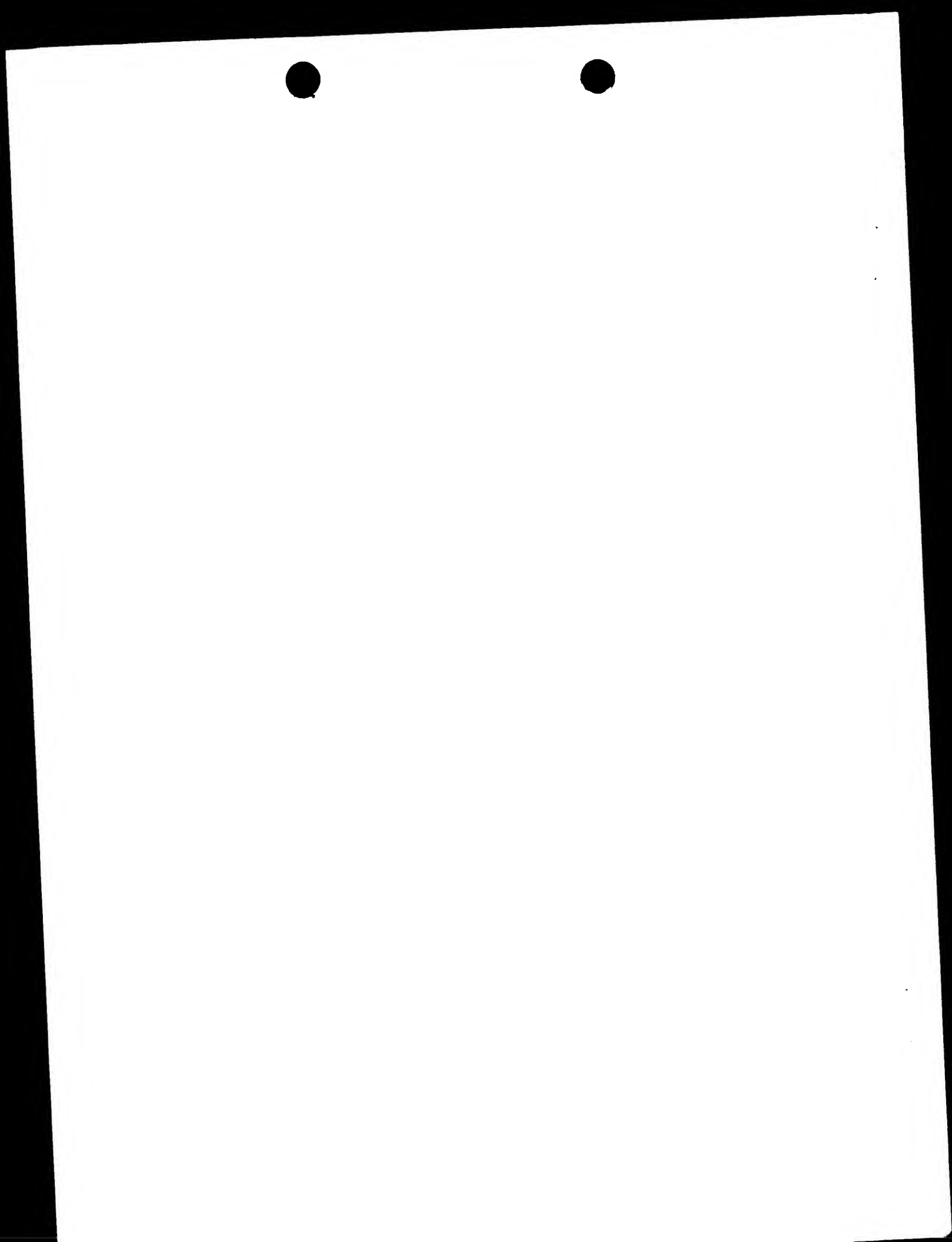
&lt;211&gt; 1269

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 10

cagtgcacaa acggctttag cctggaccgc cagtcaggac agtgtctaga tatitgaigaa 60





tgccggacca tccctgaggc ttgtcgtggg gacatgatgt gtgtcaacca gaatggcggg 120  
tatttgtgca tccctegaac caaccagtg tatcgagggc ctactcaaa tccctactct 180  
acatcctact caggcccata cccagcagcg gcccaccag taccagctc caactacccc 240  
acgatttcaa ggctcttgt ctgccgttt gggtatcaga tggatgaagg caaccagtgt 300  
gtggatgtgg acgagtgtgc aacagactca caccagtgc accctacca gatctgtatc 360  
aacactgaag gaggttacac ctgtctctgc accgatgggt actggcttct ggaagggcag 420  
tgccatgata ttgatgaatg tcgtatggt tactgccage agctctgtgc aaatgttcca 480  
ggatcctatt cctgtacaig caaccctggt ttacccctca acgacgatgg aaggtcttgc 540  
caagatgtga acgagtgcga aactgagaat cccgtgttgc agacctgtgt caacacctat 600  
ggctctttca tctgccgtg tgaccagga tatgaactg aggaagatgg cattcactgc 660  
agtgatatgg acgagtgcag ctctccgag ttctctgtc aacacgagt tgtgaaccag 720  
ccgggtcat acttctgtc gtgccctcca ggctacgtc tgttgatga taaccgaagc 780  
tgccaggata tcaatgaatg tgagcaccga aaccacacgt gtacctact gcagacttgc 840  
tacaatctac aagggggctt caaatgtatt gatcccatca gctgtgagga gccttatctg 900  
ctgattggtg aaaaccgtg tatgtgtcct gctgagcaca ccagctgcag agaccagcca 960  
ttaccatcc tgtatcgga catggatgtg gtgtcaggac gctccgttcc tgetgacatc 1020  
ttccagatgc aagcaacaac ccgataccct ggtgccatatt acattttcca gatcaaactc 1080  
ggcaacgagg gtcgagagtt ctatatcgcg caaacagggc ctatcagtgc caccctgggtg 1140  
atgacaagcc ccatcaaagg gccctgggac atccagctgg acttggagat gatcactgtc 1200  
aacactgtca tcaacttcag aggcagctcc gtgatccgac tgcggatata tgtgtcgcag 1260  
tatecgttc 1269

<210> 11

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 11

cgattgaatt ctagacctgc ctgagnnnn nnnnn

35

<210> 12

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

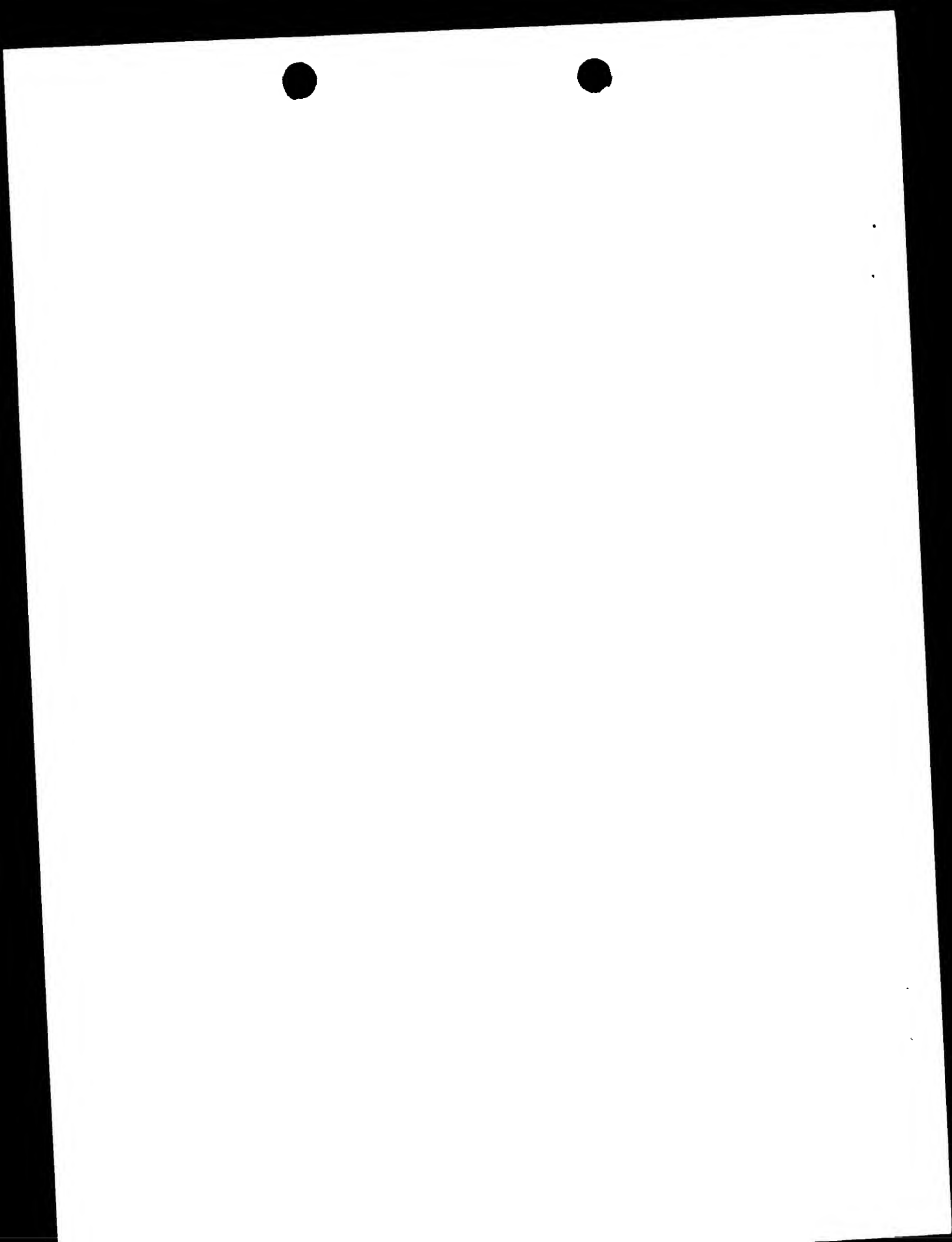
<220>

<223> Description of Artificial Sequence:mA55 R1 primer

<400> 12

cgtttgtgca ctgctgcigt gcattcc

27



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/02283

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>6</sup> C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12N5/10, A61K38/17, G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>6</sup> C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12N5/10, A61K38/17, G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

DDBJ/GenBank/EMBL/GENESEQ/Swiss-Prot/PIR

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	WO, 99/00410, A2 (Incyte Pharm. Inc.), 7 January, 1999 (07. 01. 99) & US, 5872234, A & AU, 9881608, A	1-13
PX	WO, 98/46746, A1 (Human Genome Sci. Inc.), 22 October, 1998 (22. 10. 98) & AU, 9727271, A	1-13
PX	WO, 99/00405, A1 (Genetics Inst. Inc.), 7 January, 1999 (07. 01. 99) & AU, 9881767, A	1-13
X	WO, 97/38002, A1 (Human Genome Sci. Inc.), 16 October, 1997 (16. 10. 97) & AU, 9655492, A & EP, 910569, A1	1-13
X	WO, 97/38012, A1 (Human Genome Sci. Inc.), 16 October, 1997 (16. 10. 97) & AU, 9653903, A & EP, 902791, A1	1-13

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

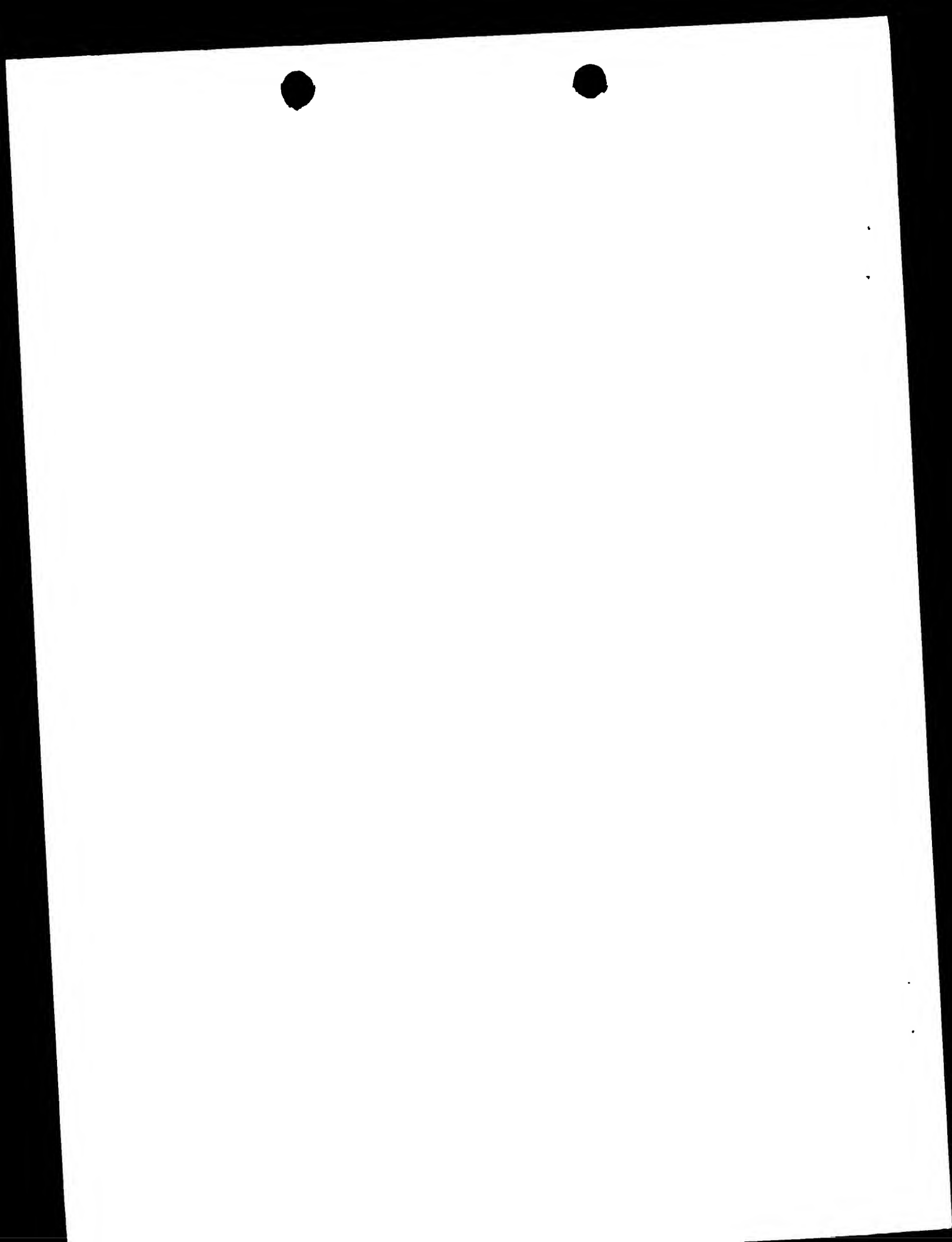
* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
2 August, 1999 (02. 08. 99)Date of mailing of the international search report  
10 August, 1999 (10. 08. 99)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12N5/10, A61K38/17, G01N33/50

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12N5/10, A61K38/17, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

DDBJ/GenBank/EMBL/GENESQ, Swiss-Prot, PIR

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	WO, 99/00410, A2 (Incyte Pharm. Inc.) 7.1月. 1999 (07.01.99) & US, 5872234, A & AU, 9881608, A	1-13
PX	WO, 98/46746, A1 (Human Genome Sci. Inc.) 22.10月. 1998(22.10.98) & AU, 9727271, A	1-13
PX	WO, 99/00405, A1 (Genetics Inst. Inc.) 7.1月. 1999 (07.01.99) & AU, 9881767, A	1-13
X	WO, 97/38002, A1 (Human Genome Sci. Inc.) 16.10月. 1997(16.10.97) & AU, 9655492, A &	1-13

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02.08.99

国際調査報告の発送日

10.08.99

国際調査機関の名称及び郵便先

日本国特許庁 (ISA-JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

滝本 晶子

4B

9452

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP99/02283

C (続き) . 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
X	<p>EP, 9 1 0 5 6 9, A 1</p> <p>WO, 9 7 / 3 8 0 1 2, A 1 (Human Genome Sci. Inc.) 16. 10月. 1997(16. 10. 97) &amp; AU, 9 6 5 3 9 0 3, A &amp; EP, 9 0 2 7 9 1, A 1</p>	1 - 1 3



P C T

## 国際予備審査報告

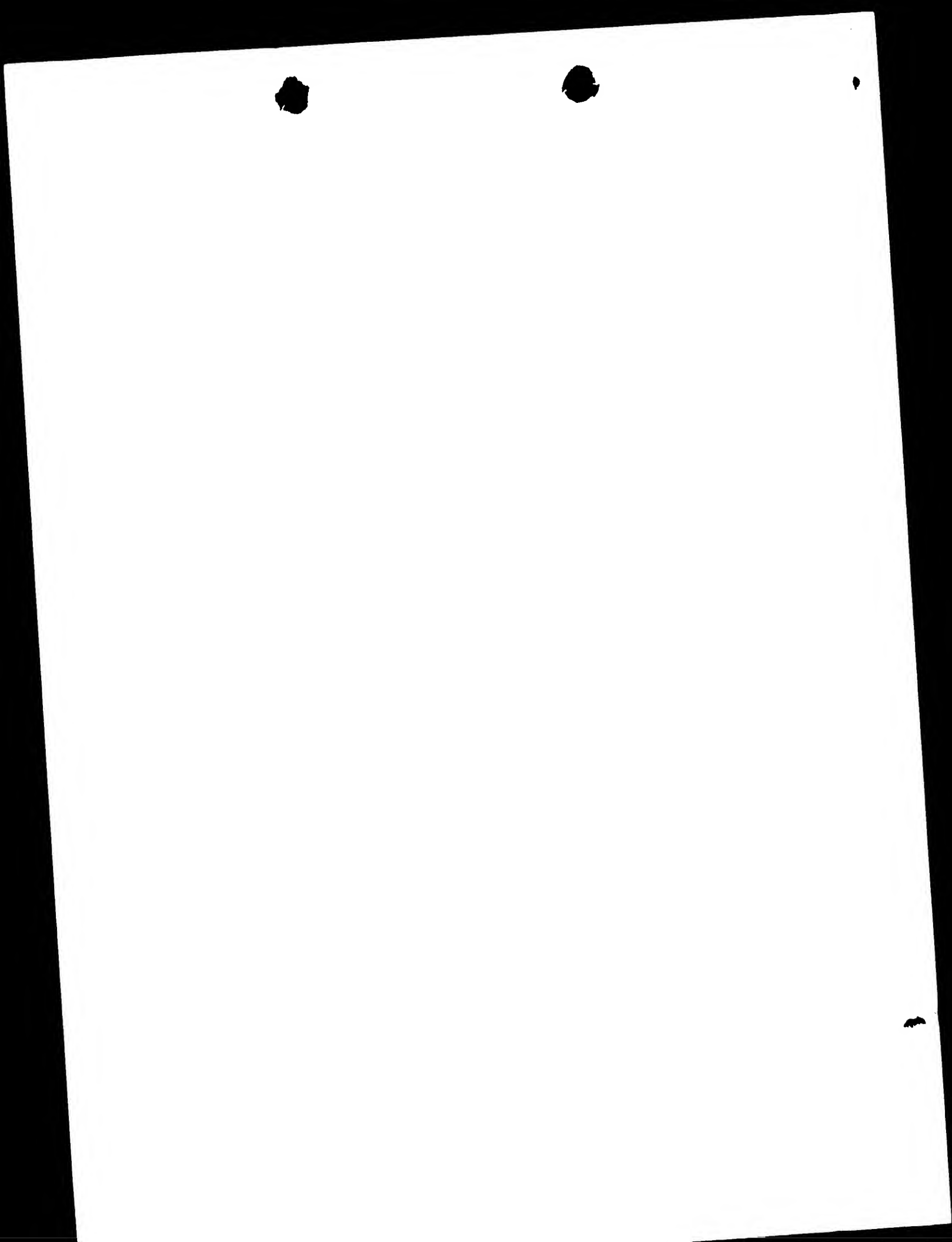
(法第12条、法施行規則第56条)  
[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 ONF-2969PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/02283	国際出願日 (日.月.年) 28.04.99	優先日 (日.月.年) 28.04.98
国際特許分類 (IPC) Int. Cl. <sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12N15/10, A61K38/17, G01N33/50		
出願人(氏名又は名称) 小野薬品工業株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 5 ページからなる。
- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で                      ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☒ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☒ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 13.10.99	国際予備審査報告を作成した日 21.03.00	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 平田 和男 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4 B 7823



## 1. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に  
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT 19条の規定に基づき補正されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

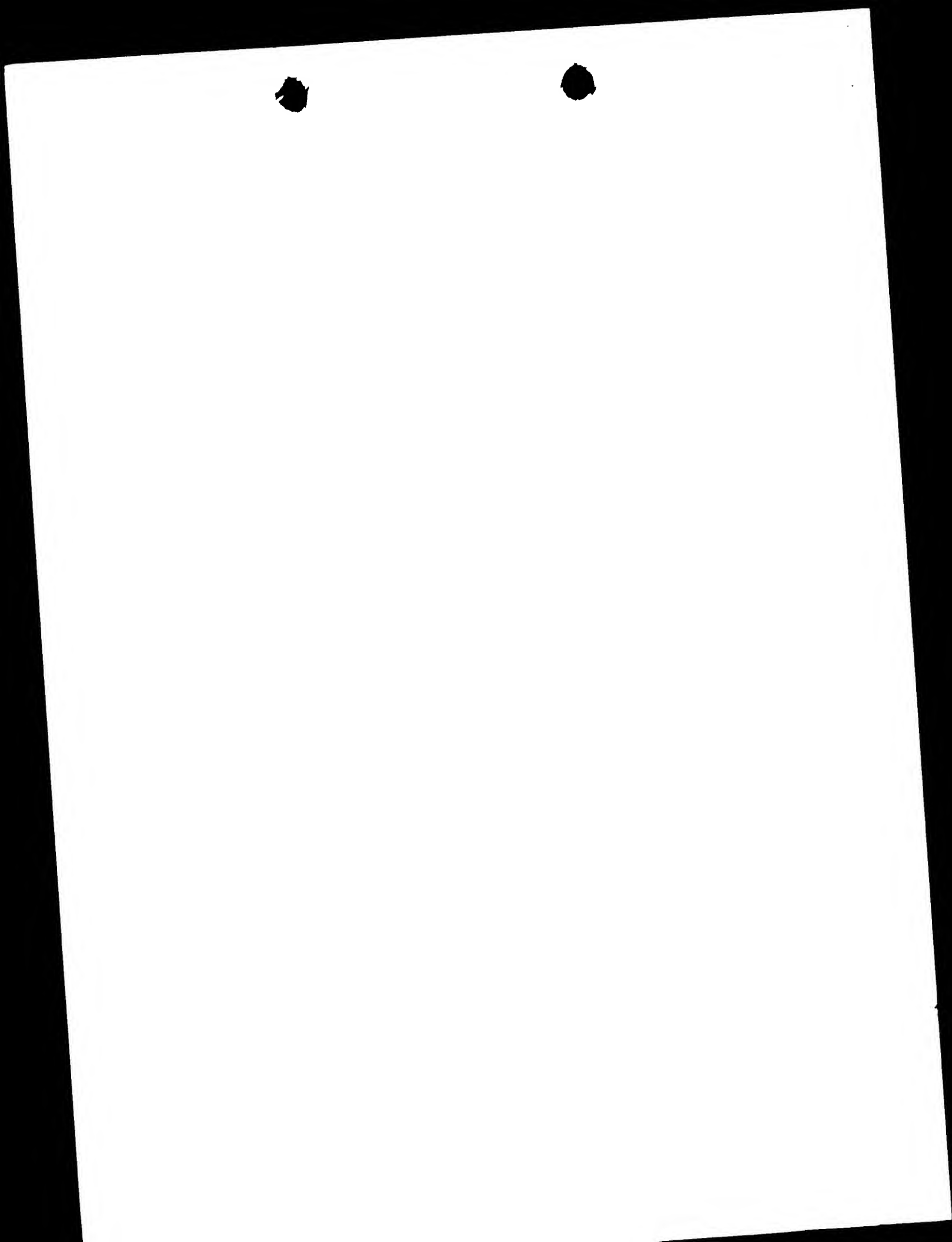
3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☒ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)



## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)

請求の範囲	1 2	有
請求の範囲	1-11, 13	無

進歩性(IS)

請求の範囲	1 2	有
請求の範囲	1-11, 13	無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲	1-13	有
請求の範囲		無

## 2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

国際調査報告で引用された文献4(WO, 97/38002, A1(Human Genome Sci. Inc.)16.10月.1997(16.10.97))にヒトの心臓でよく発現しているEGF様タンパク質のcDNAが記載され、その示された配列からみて本願のものとホモログといえるほどホモロジーが高いものである。また、適宜なフラグメントを選べば、本願のものと一致する。また、ヒトで知られたcDNA配列をもとにマウスの遺伝子をクローニングすることは当業者にとって自明である。また、例として発現してタンパク質を得ることが示されている。また、モノクローナル抗体を調製することや、治療に用いえることも説明されている。さらに、タンパク質がアンタゴニストのスクリーニングに用い得ることは自明である。

よって、請求の範囲1-11、13は、新規性がない。



## VI. ある種の引用文献

## 1. ある種の公表された文書 (PCT規則70.10)

出願番号 特許番号	公知日 (日. 月. 年)	出願日 (日. 月. 年)	優先日 (有効な優先権の主張) (日. 月. 年)
WO, 99/00410, A2	07. 01. 99	23. 06. 98	27. 06. 97
WO, 98/46746, A1	22. 10. 98	11. 04. 97	
WO, 99/00405, A1	07. 01. 99	29. 06. 98	30. 06. 97

## 2. 書面による開示以外の開示 (PCT規則70.9)

書面による開示以外の開示の種類	書面による開示以外の開示の日付 (日. 月. 年)	書面による開示以外の開示に言及している 書面の日付 (日. 月. 年)
-----------------	------------------------------	--

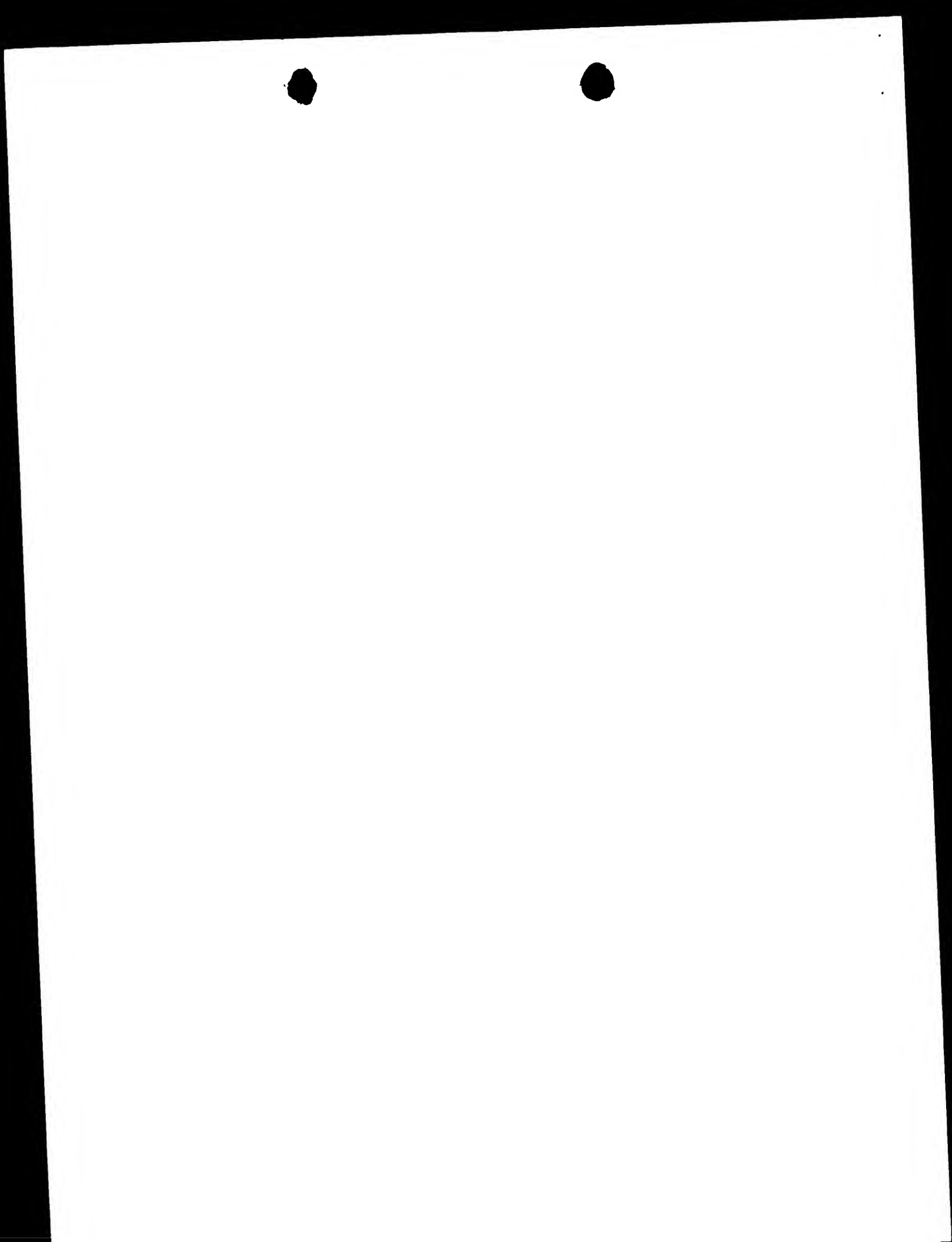




## VII. 国際出願に対する意見

請求の範囲、明細書及び図面の明瞭性又は請求の範囲の明細書による十分な裏付についての意見を次に示す。

請求の範囲 1 2 に関して、明細書に動脈硬化または経皮的冠動脈形成術後の再狭窄をもたらす血管内膜肥厚、筋腫の治療に関する具体的な記載がなされていないので、該請求の範囲が明細書によって十分に裏付けられていない。



ST  
**Translation**

PATENT COOPERATION TREATY

**PCT**

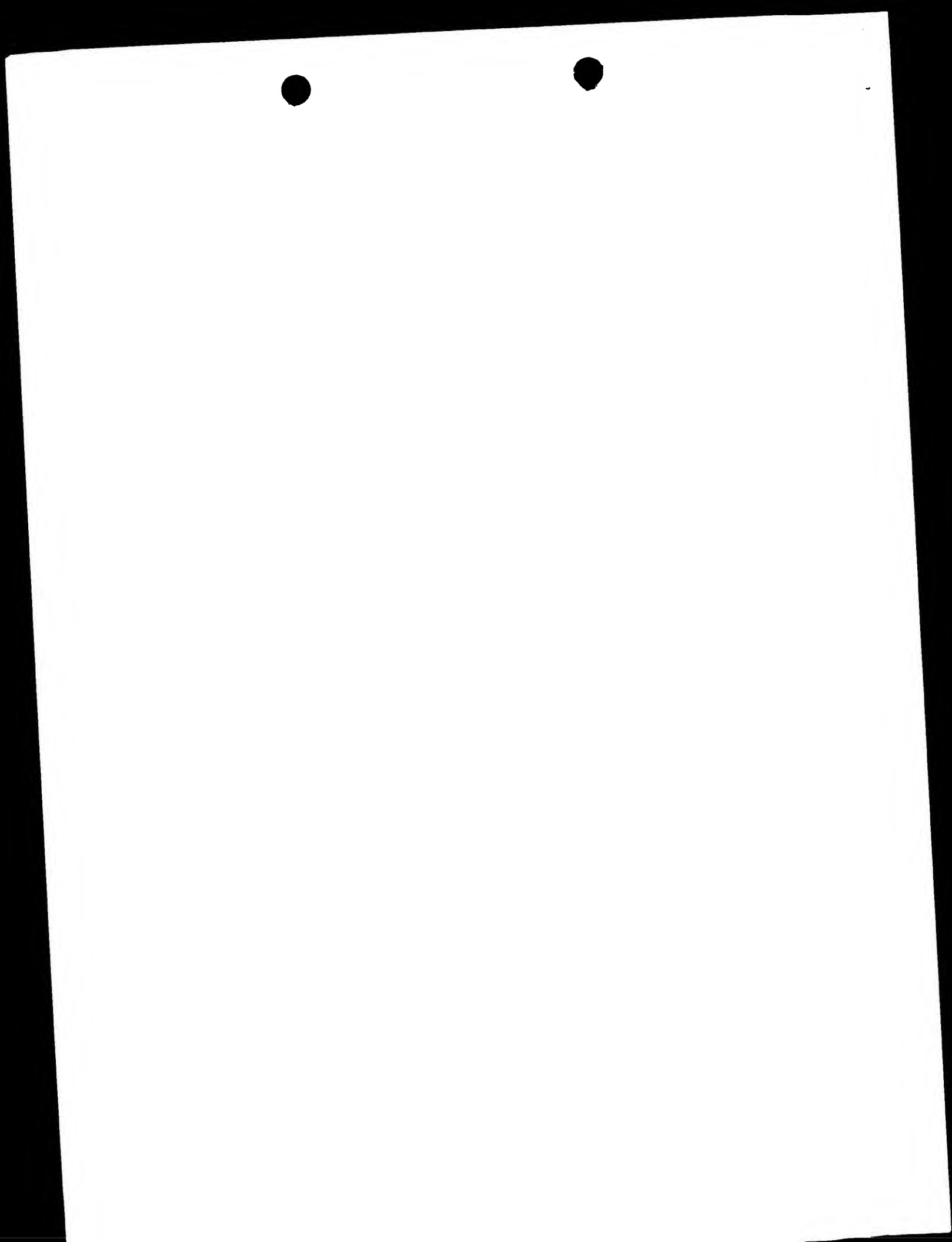
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference <b>ONF-2969PCT</b>	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. <b>PCT/JP99/02283</b>	International filing date ( <i>day month year</i> ) <b>28 April 1999 (28.04.99)</b>	Priority date ( <i>day month year</i> ) <b>28 April 1998 (28.04.98)</b>
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC <b>C12N 15/12, C07K 14/47, 16/18, C12N 15/10, A61K 38/17, G01N 33/50</b>		
Applicant <b>ONO PHARMACEUTICAL CO., LTD.</b>		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input checked="" type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>

Date of submission of the demand <b>13 October 1999 (13.10.99)</b>	Date of completion of this report <b>21 March 2000 (21.03.2000)</b>
Name and mailing address of the IPEA JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/02283

## I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☒ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/02283

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

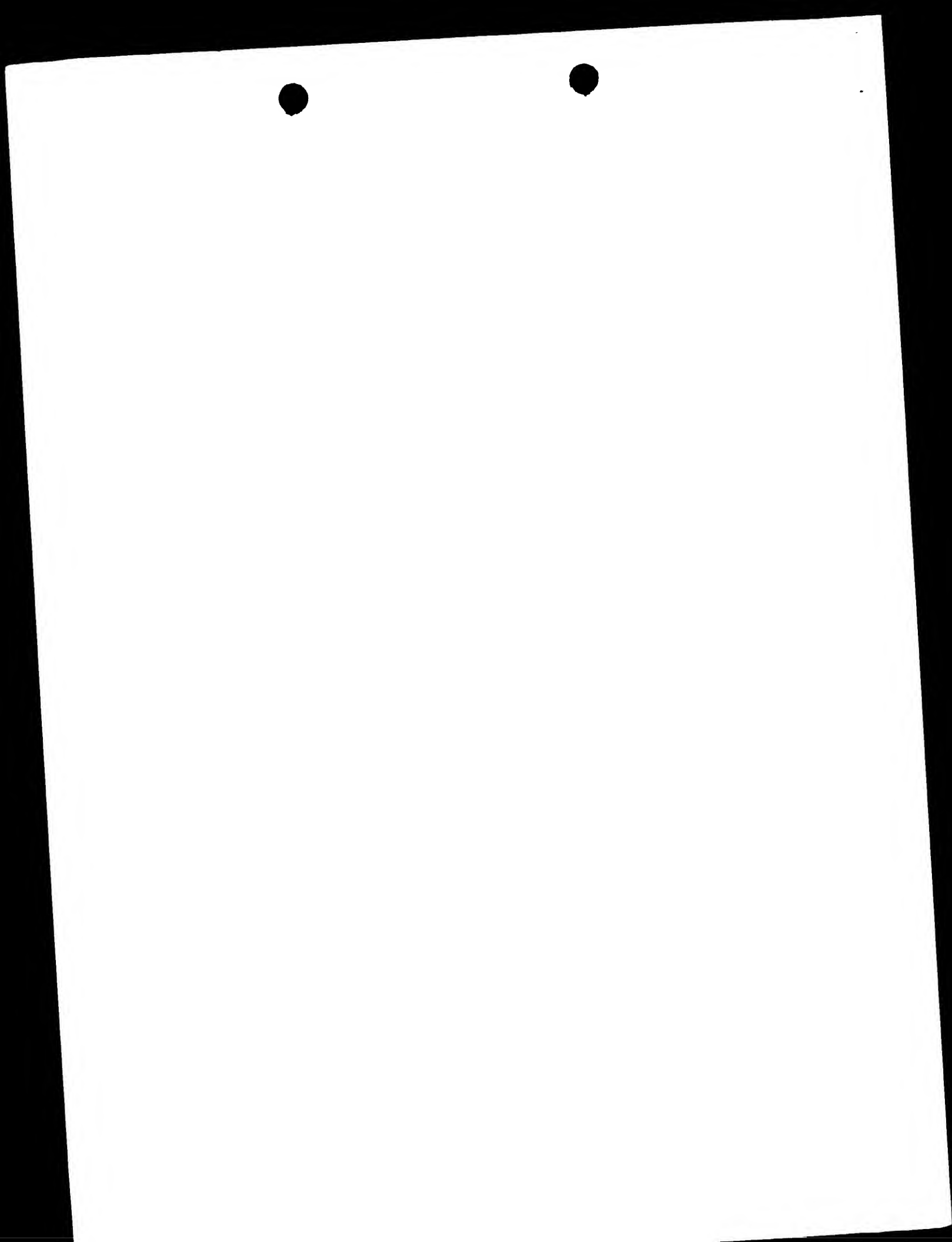
## 1. Statement

Novelty (N)	Claims	12	YES
	Claims	1-11,13	NO
Inventive step (IS)	Claims	12	YES
	Claims	1-11,13	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-13	YES
	Claims		NO

## 2. Citations and explanations

Document 4 [WO. 97/38002, A1 (Human Genome Sciences Inc.) 16 November 1997 (16.10.97)] cited in the international search report describes cDNA of an EGF-like protein that is well-expressed in the human heart, and based on the sequence described therein, the homology is so strong that it may be considered a homologue of the item described in this application. In addition, if certain fragments are selected, it is identical to the item described in this application. The cloning of mouse genes based on cDNA sequences known in humans is obvious to persons skilled in the art. Document 4 also discloses that a protein is obtained by expression of this cDNA as an example. It also describes the preparation of a monoclonal antibody and that such an antibody can be used for therapy. In addition, the fact that a protein can be used for the screening of antagonists is obvious.

Therefore, the subject matter of Claims 1-11 and 13 does not appear to be novel.





# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/02283

## VI. Certain documents cited

### 1. Certain published documents (Rule 70.10)

Application No. Patent No.	Publication date (day month year)	Filing date (day month year)	Priority date (valid claim) (day month year)
WO.99 00410.A2	07 January 1999 (07.01.1999)	23 June 1998 (23.06.1998)	27 June 1997 (27.06.1997)
WO.98 46746.A1	22 October 1998 (22.10.1998)	11 April 1997 (11.04.1997)	
WO.99 00405.A1	07 January 1999 (07.01.1999)	29 June 1998 (29.06.1998)	30 June 1997 (30.06.1997)

### 2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

Kind of non-written disclosure	Date of non-written disclosure (day month year)	Date of written disclosure referring to non-written disclosure (day month year)
--------------------------------	--	---



**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

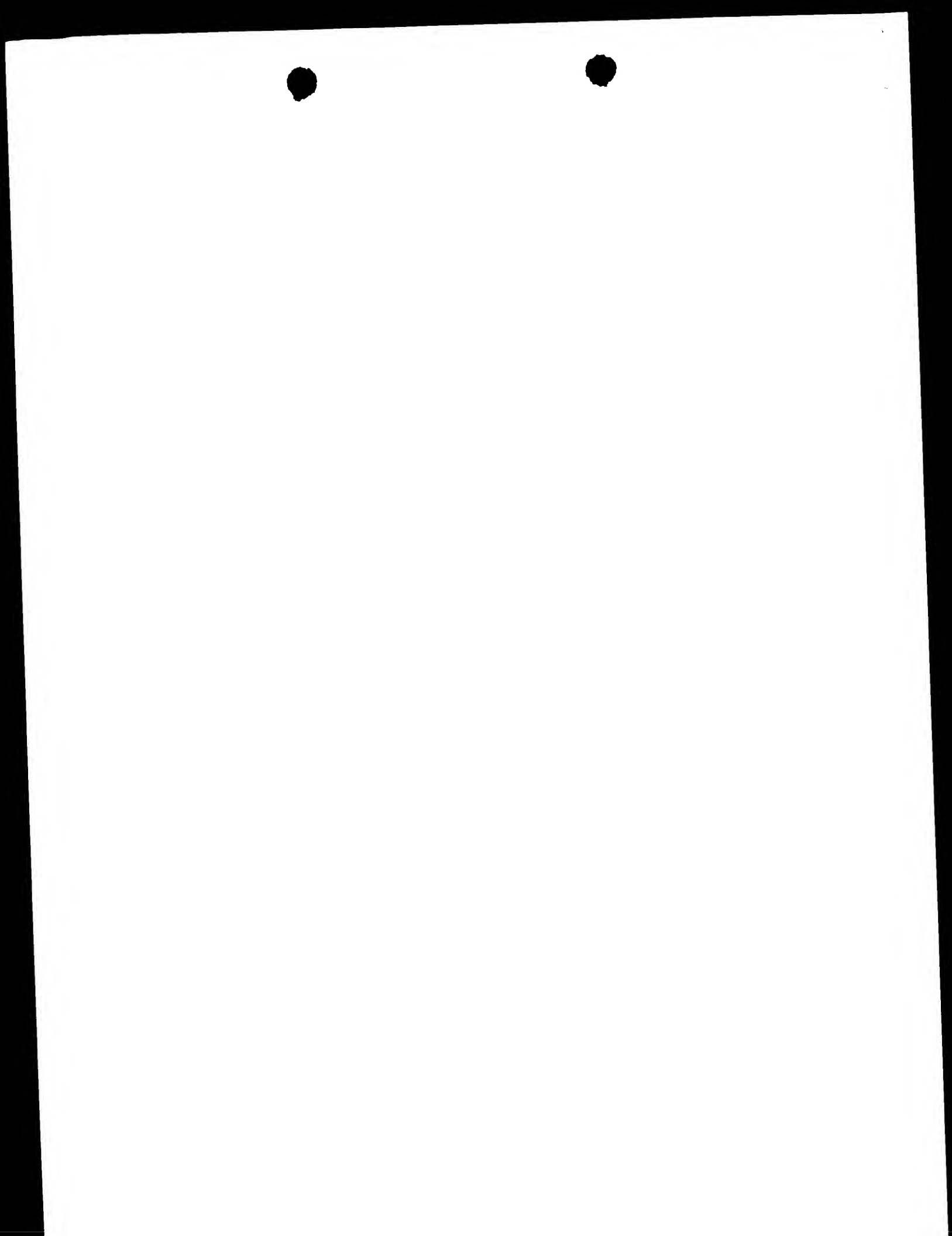
International application No.

PCT/JP99/02283

**VIII. Certain observations on the international application**

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

Claim 12 is not supported by the Specification because the Specification does not contain specific descriptions concerning treatment of myeloma and of hypertrophy of the tunica intima brought about by arteriosclerosis or recurrent stenosis subsequent to percutaneous transluminal coronary angioplasty.



EP



PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)

[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 ONF-2969PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/02283	国際出願日 (日.月.年) 28.04.99	優先日 (日.月.年) 28.04.98
出願人(氏名又は名称) 小野薬品工業株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

#### 1. 国際調査報告の基礎

- a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。  
☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。
- b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。  
☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

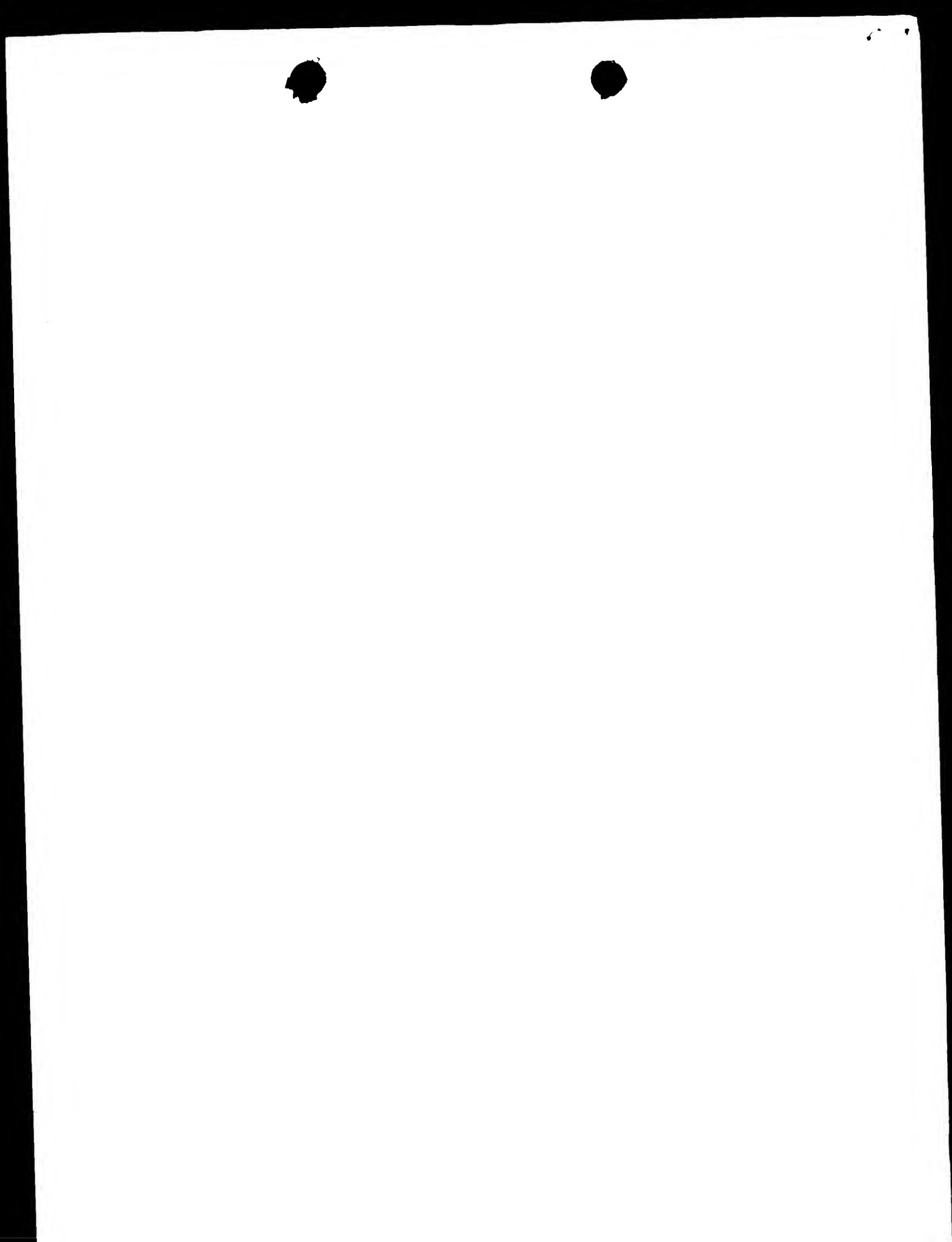
2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。  
☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。  
☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、  
 第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。 ☒ なし  
☐ 出願人は図を示さなかった。  
☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12N5/10, A61K38/17, G01N33/50

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/12, C07K14/47, C07K16/18, C12N5/10, A61K38/17, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

DDBJ/GenBank/EMBL/GENSEQ/Swiss-Prot/PIR

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	WO, 99/00410, A2 (Incyte Pharm. Inc.) 7.1月.1999 (07.01.99) & US, 5872234, A & AU, 9881608, A	1-13
PX	WO, 98/46746, A1 (Human Genome Sci. Inc.) 22.10月. 1998(22.10.98) & AU, 9727271, A	1-13
PX	WO, 99/00405, A1 (Genetics Inst. Inc.) 7.1月.1999 (07.01.99) & AU, 9881767, A	1-13
X	WO, 97/38002, A1 (Human Genome Sci. Inc.) 16.10月. 1997(16.10.97) & AU, 9655492, A &	1-13

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02.08.99

国際調査報告の発送日

10.08.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

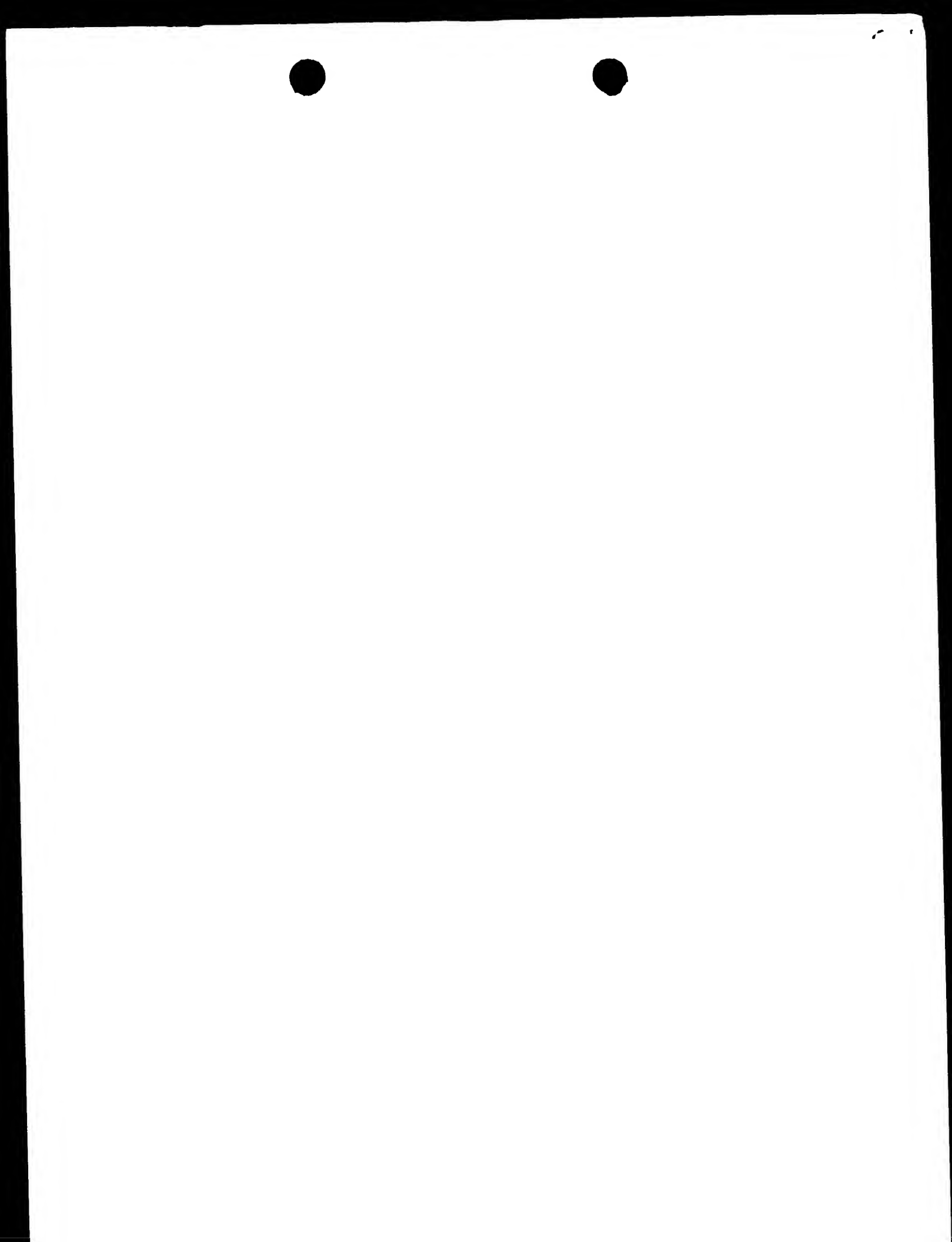
特許庁審査官 (権限のある職員)

滝本 晶子

4B

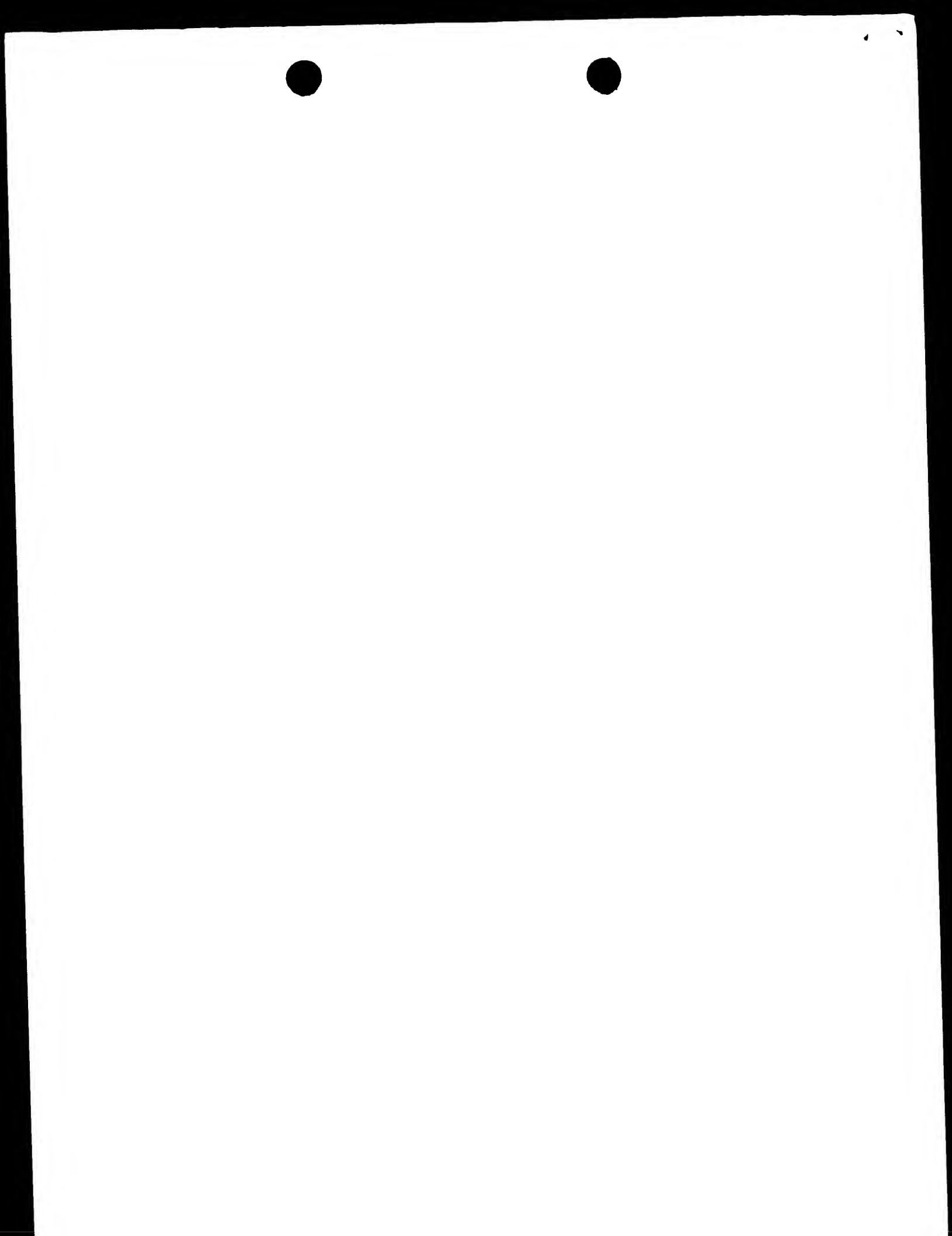
9452

電話番号 03-3581-1101 内線 3448





C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	EP, 910569, A1 WO, 97/38012, A1 (Human Genome Sci. Inc.) 16.10月. 1997(16.10.97) & AU, 9653903, A & EP, 902791, A1	1-13



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

D E C L A R A T I O N

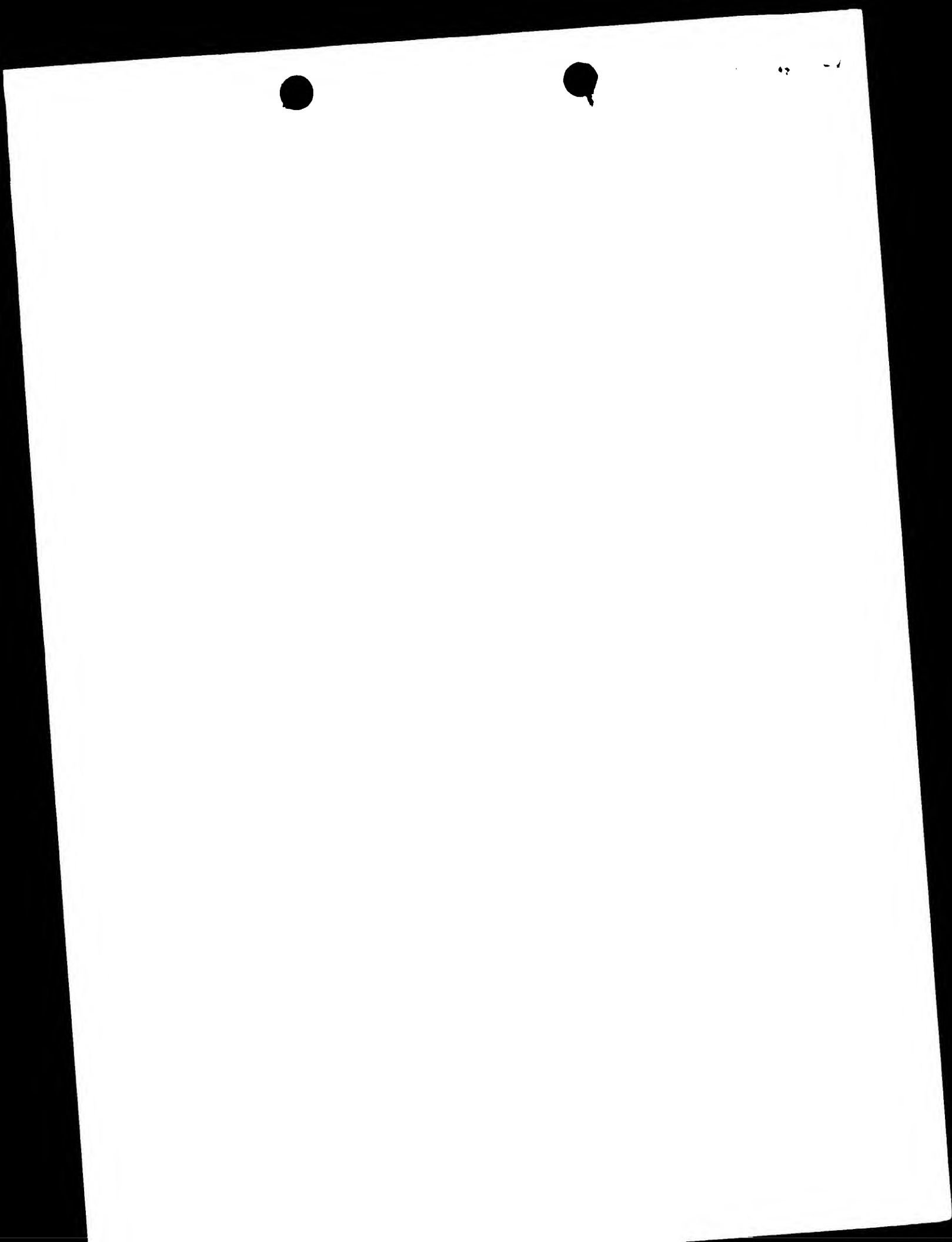
I, Tetsuya Kato, declare:

1. That I am a Japanese subject, residing at c/o Minase Research Institute, Ono Pharmaceutical Co., Ltd., 1-1, Sakurai 3-chome, Shimamoto-cho, Mishima-gun, OSAKA, JAPAN.
2. That I am well acquainted with the Japanese and English languages.
3. That the attached is true translation into the English language of the accompanying certified copy of the Application for Patent filed in Japan on April 28th, 1998, under the number Heisei 10-119731.
4. That all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements are made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code, and that such willful false statements may jeopardize the validity of the Patent Application the United States of America of any patent issuing thereon.

Dated this 16th day of October, 2000.



Tetsuya Kato



Translation:

Patent Office  
Japanese Government

This is to certify that the annexed is a true copy of the following  
application as filed this Office.

Date of Application: April 28th, 1998  
Application number : Patent Application No. Heisei 10-119731  
Applicant(s) : Ono Pharmaceutical Co., Ltd.

Dated this May 28th, 1999

Takeshi Isayama

-----  
Commissioner,

Patent Office

Certificate No. Patent Heisei

11-3034413



Document Name: Application for Patent  
Reference No.: GEJP-52  
Submitted date: 27th April, 1998  
Direction: Commissioner, Patent Office  
IPC: C12N 15/00  
C07K 7/00

Title of the Invention: A novel polypeptide, a method of producing it, a cDNA encoding it, a vector containing it, a host cell transformed with the vector, an antibody of the peptide, a pharmaceutical composition containing the polypeptide or the antibody, a screening method with using the polypeptide  
Number of claims: 13

Inventor:

Address: 19-4, Ohsagi-cho, Iwakura, Sakyo-ku, Kyoto.  
Name: Tasuku Honjo

Inventor:

Address: 93, Higashiohno-cho, Koyama, Kita-ku, Kyoto  
Name: Kei Tashiro

Inventor:

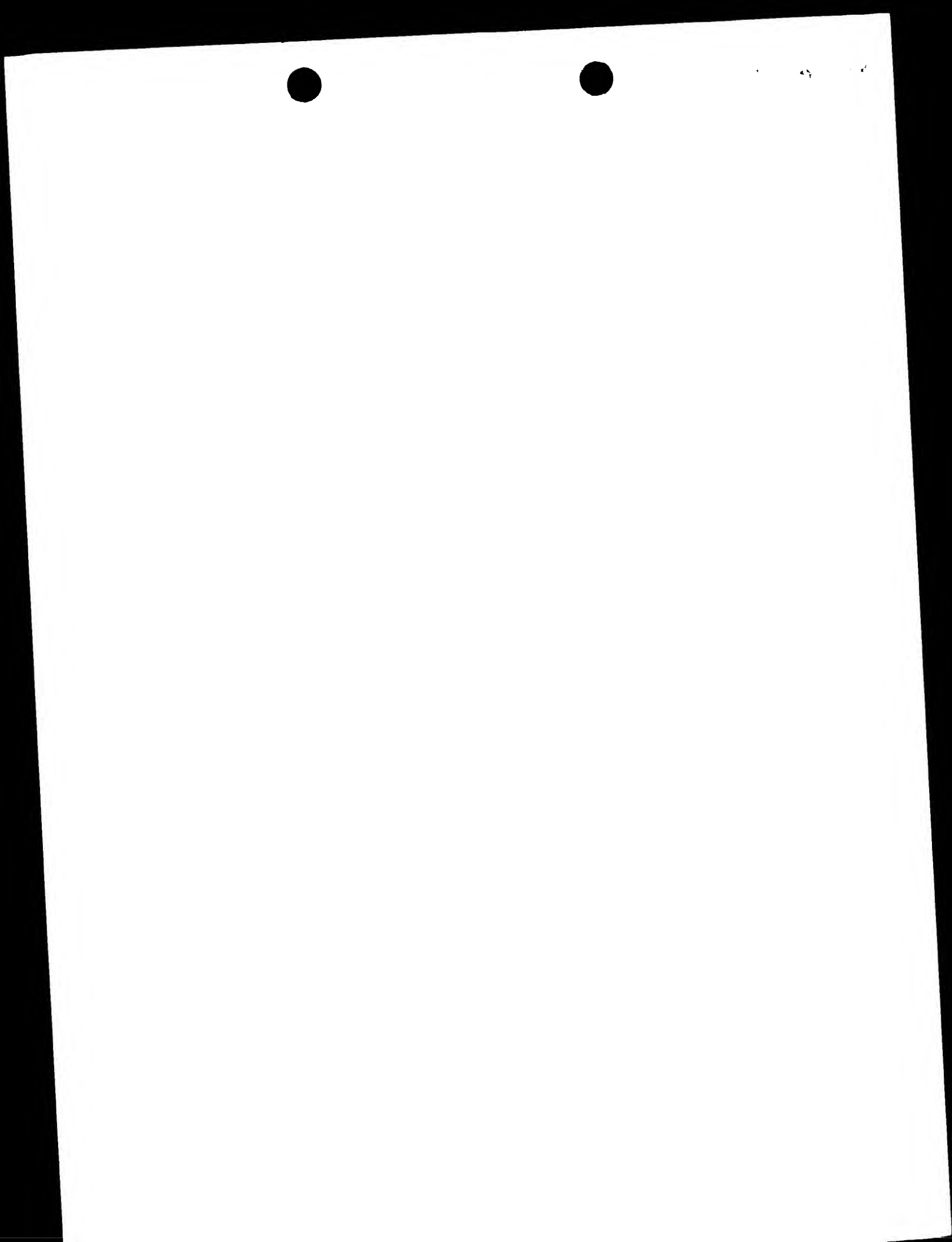
Address: 7665, Palmira Dr., #5324, San Diego, CA, U.S.A.  
Name: Tomoyuki Nakamura

Applicant:

ID NO.: 000185983  
Zip code: 541  
Address: 2-1-5, Doshomachi, Chuo-ku, Osaka  
Name: Ono Pharmaceutical Co., Ltd.  
Representative: Toshio Ueno

Charge:

Method for payment: prepaid





No. of Ledger: 029595

Sum of prepaid: 21,000

List of Attached document:

Item:	Specification	1
-------	---------------	---

Item:	Figures	2
-------	---------	---

Item:	Abstract	1
-------	----------	---

Proof: Yes



**Document Name:** Specification

**Title of the Invention:**

A novel polypeptide, a method for preparation of it, a cDNA encoding the polypeptide

**Claims**

1. Substantially purified form of the polypeptide that comprising the amino-acid sequence shown in SEQ ID NO. 1, 4, 6, 9, 11 or 14, homologue thereof, fragment thereof or homologue of the fragment.

2. A polypeptide according to claim 1 that comprising the amino-acid sequence shown in SEQ ID NO. 1, 4, 6, 9, 11 or 14.

3. A cDNA encoding the polypeptide according to claim 1.

4. A cDNA according to claim 3 that comprising the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO. 2, 5, 7, 10, 12 or 15 or a fragment cDNA selectively hybridized to the cDNA.

5. A cDNA according to claim 3 that comprising the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO. 3, 8 or 13 or a fragment cDNA selectively hybridized to the cDNA.

6. A replication or expression vector carrying the cDNA according to claim 3 to 5.

7. A host cell transformed with the replication or expression vector according to claim 6.

8. A method for producing the polypeptide according to claim 1 or 2 which comprises culturing a host cell according to claim 7 under a condition effective to express the polypeptide according to claim 1 or 2.

9. A monoclonal or polyclonal antibody against the polypeptide according to claim 1 or 2.

10. A pharmaceutical composition containing the polypeptide

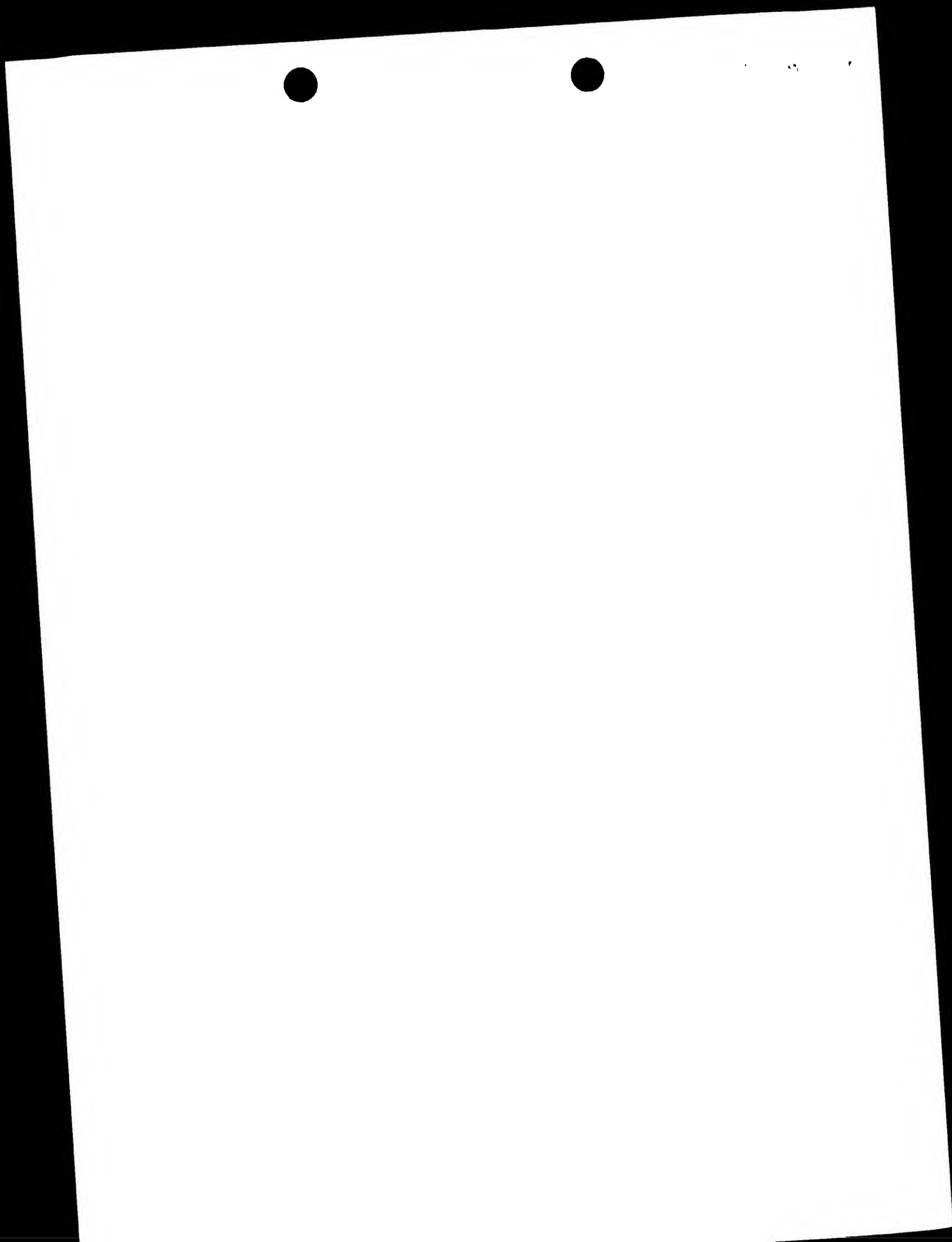


according to claim 1 or 2 or the antibody according to claim 9, in association with pharmaceutically acceptable diluent and/or carrier.

11. A pharmaceutical composition for the treatment of abnormal growth of smooth muscle cell, containing a polypeptide according to claim 1 or 2, in association with a pharmaceutically acceptable diluent and/or carrier.

12. A pharmaceutical composition for the treatment of arteriosclerosis, restenosis after PTCA or myosarcoma, containing the polypeptide according to claim 1 or 2, in association with a pharmaceutically acceptable diluent and/or carrier.

13. A screening method for an antagonist or agonist of the polypeptide according to claim 1 or 2 with using the said polypeptide.



## **Detailed Description of the Invention**

### **Field of the Invention**

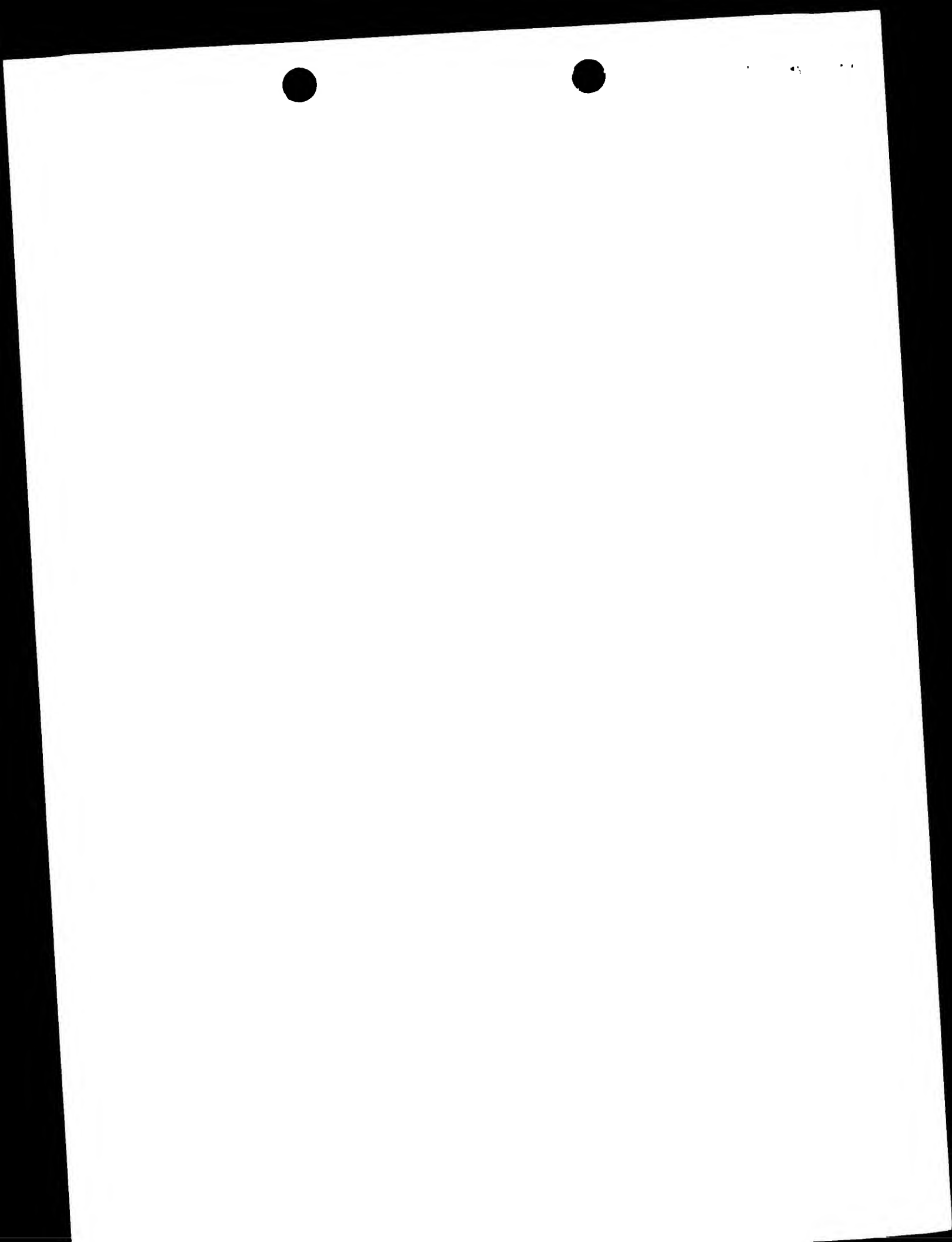
The present invention provides a novel polypeptide, a method for preparation of them, a cDNA encoding the polypeptide, a vector containing it, a host cell transformed with the vector, an antibody of the peptide, a pharmaceutical composition containing the polypeptide or the antibody, a screening method with using the polypeptide.

### **Problems to be Solved**

The present inventors investigated to find novel factors (polypeptides) which are useful for study or for the treatment or diagnosis of diseases induced by abnormal proliferation of smooth muscle. Especially, we had aimed secreted proteins and membrane proteins which have signal sequences for secretion.

### **Background of the Invention**

In modern medical research, cardiovascular biology is a field that attracts considerable attention because cardiovascular disease is the leading cause of mortality. Cardiovascular research has revealed important facts about neointimal formation and arterial remodeling, both of which are thought to contribute to plaque formation in atherosclerosis and blood vessel narrowing. For example, there are three aspects of the cellular process in hypercholesterolaemia induced blood vessel damage in animal models that mimic human development of arteriosclerotic coronary disease. The three elements that form lesions on the artery wall are: a) proliferation of smooth muscle cells, macrophages and lymphocytes, b) formation of connective tissues (mainly elastic fiber proteins, collagen and proteoglycans made by smooth muscle cells in a process similar to scar formation), and c) the accumulation





of lipid and cholesterol in the newly formed connective tissue matrices. The exact sequence of the three damaging elements are debatable, but it is clear that the abnormal dedifferentiation, redifferentiation and growth of smooth muscle cells contribute structurally to vessel damage. Moreover, another significant pathological process that involves abnormal smooth muscle cell growth is restenosis after Percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA).

The present inventors made reasonable efforts, by isolation of the molecules related to participation of smooth muscle cells in angiogenesis, for the aim to utilize them for regulation of abnormal proliferation of smooth muscle cells such like described above.

In order to obtain a certain polypeptide or cDNA coding for the same, there has been generally employed a method composed of detecting the aimed biological activity in a tissue or a cell culture medium, then identifying a polypeptide as substance of the activity through the isolation and purification and isolating a gene encoding the polypeptide or expression-cloning method to isolate a gene by access of the biological activity of the polypeptide encoded by it.

Because in many cases, however, physiologically active polypeptides have various biological activities, when taking the method to approaches based on a certain activity to isolate a gene, it has increasingly been happened that the gene is turned out to be identical to a known gene which has another activity after spending much efforts to isolate it. And because, in many cases, biological factors are produced only in a very slight amount or only in a specific condition, it is often made difficult to isolate and purify a factor and detect its biological activity.

#### Related Arts



Recent rapid developments in techniques for constructing cDNAs and sequencing techniques have made it possible to quickly sequence a large amount of cDNAs. By utilizing these techniques, a process, which comprises constructing cDNAs at random, identifying the nucleotide sequences thereof, expressing novel polypeptides encoded by them, is now in progress. Although this process is advantageous in that a gene can be cloned and information regarding its nucleotide sequence can be obtained without any biochemical or genetic analysis, the target gene can be discovered thereby only accidentally in many cases.

#### **Means for solving the problems**

The present inventors have studied cloning method of genes coding proliferation and/or differentiation factors functioning in hematopoietic systems and immune systems. Focusing their attention on the fact that most of the secretory proteins such as proliferation and/or differentiation factors (for example various cytokines) and membrane proteins such as receptors thereof (hereafter these proteins will be referred to generally as secretory proteins and the like) have sequences called signal peptides in the N-termini, the inventors conducted extensive studies on a process for efficiently and selectively cloning a gene coding for a signal peptide. Finally, we have successfully invented a screening method for cDNAs having sequence encoding signal peptides, we called the method as signal sequence trap (SST) (Japanese Patent Application No. 6-13951).

We also developed yeast SST method on the same concept. By the method using yeast, genes including sequence encoding signal peptide can be identified more easily and effectively (USP No. 5,536,637).

By using the present method, the present inventors identified novel secreted protein produced by mouse embryonic heart and human kidney and a



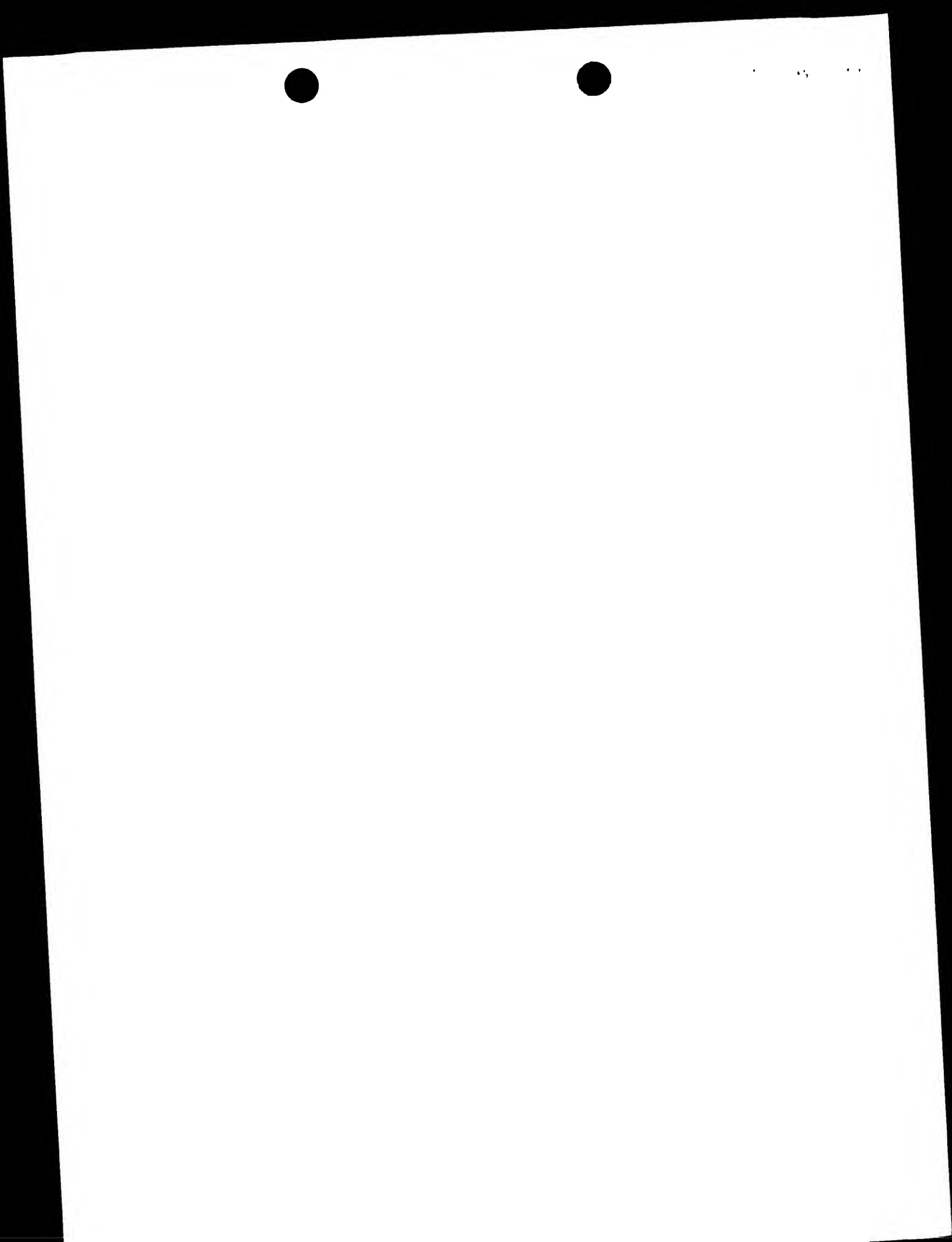
cDNA fragments encoding them, and by using the sequence information of the cDNA fragments they isolated each full-length cDNA from mouse embryonic heart and human kidney. And they discovered that the polypeptides had functions to suppress smooth muscle cells.

The present cDNA sequence was identified as a clone mouse A55 and isolated from cDNA library derived from mouse embryonic heart based on genetic information obtained by using the Yeast SST method described above. The clone, mouse A55 is a full-length cDNA encoding a secreted polypeptide (which is called mouse A55 polypeptide here).

The present cDNA sequence was named as a clone human A55 and isolated from cDNA library derived from human brain based on genetic information obtained from human kidney by using the Yeast SST method described above. The clone, human A55 is a full-length cDNA encoding a secreted polypeptide (which is called human A55 polypeptide here).

There was no DNA sequence which is identical to that of mouse and human A55 of the present invention, when DNA sequence of mouse and human A55 were compared with data base by BLASTN and FASTA. And there was no polypeptides which is identical to that of mouse and human A55 of the present invention, when amino acid sequence of mouse and human A55 was compared with data base by BLASTX, BLASTP and FASTA. So the polypeptides of the present invention are considered to be novel.

The inventors discovered that the polypeptides had functions to suppress smooth muscle cells. Accordingly, the polypeptides may be useful for treatment of diseases related to abnormal proliferation of smooth muscle cells, for example, arteriosclerotic coronary disease, neointimal formation which results in restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty and myosarcoma.



## Constitution of the Invention

The present invention provides:

- 1) a polypeptide having an amino acid sequence shown in SEQ ID NO. 1, 4, 6, 9, 11 or 14,
- 2) a cDNA encoding the polypeptide described above (1),
- 3) a cDNA having a nucleotide sequence shown in SEQ ID NO. 2, 5, 7, 10, 12 or 15,
- 4) a cDNA that consists of a nucleotide sequence shown in SEQ ID NO. 3, 8 or 13.

## Detailed Discliption

The present invention is concerned with a polypeptide that consists of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO. 1, 4, 6, 9, 11 or 14 in substantially purified form, a homologue thereof, a fragment of the sequence and a homologue of the fragment.

Further, the present invention is concerned with a cDNA encoding the above peptides. More particularly the present invention is provided cDNA having the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO. 2, 5, 7, 10, 12 or 15, and cDNA containing a fragment which is selectively hybridizing to the cDNA that consists of nucleotide sequence shown in SEQ ID NO. 2, 5, 7, 10, 12 or 15. Complementary sequence of the above nucleotide sequence is also included in cDNA selectively hybridized. Hybridization are performed in a stringent condition.

A polypeptide comprising amino acid sequence shown in SEQ ID NO. 1, 4, 6, 9, 11 or 14 in substantially purified form will generally comprise the polypeptide in a preparation in which more than 90%, e.g. 95%, 98% or 99% of the polypeptide in the preparation is that of the SEQ ID NO. 1, 4, 6, 9, 11 or 14.





A homologue of polypeptide comprising amino acid sequence shown in SEQ ID NO. 1, 4, 6, 9, 11 or 14 will be generally at least 70%, preferably at least 80 or 90% and more preferably at least 95% homologous to the polypeptide of SEQ ID NO. 1 over a region of at least 20, preferably at least 30, for instance 40, 60 or 100 more contiguous amino acids. Such a polypeptide homologue will be referred to a polypeptide of the present invention.

Generally, a fragment of polypeptide comprising amino acid sequence shown in SEQ ID NO. 1, 4, 6, 9, 11 or 14 or its homologues will be at least 10, preferably at least 15, for example 20, 25, 30, 40, 50 or 60 amino acids in length, and are also referred to by the term "a polypeptide of the present invention".

A cDNA capable of selectively hybridizing to the cDNA comprising nucleotide sequence shown in SEQ ID NO. 2, 5, 7, 10, 12 or 15 will be generally at least 70%, preferably at least 80 or 90% and more preferably at least 95% homologous to the cDNA of SEQ ID NO. 2, 5, 7, 10, 12 or 15 over a region of at least 20, preferably at least 30, for instance 40, 60 or 100 or more contiguous nucleotides. Such cDNA will be referred to "a cDNA of the present invention".

Fragments of the cDNA comprising nucleotide sequence shown in SEQ ID NO. 2, 5, 7, 10, 12 or 15 will be at least 10, preferably at least 15, for example 20, 25, 30 or 40 nucleotides in length, and will be also referred to "a cDNA of the present invention" as used herein.

A further embodiment of the present invention provides replication and expression vectors carrying cDNA of the invention. The vectors may be, for example, plasmid, virus or phage vectors provided with an origin of replication, optionally a promoter for the expression of the said cDNA and optionally a regulator of the promoter. The vector may contain one or more selectable marker genes, for example a ampicillin resistance gene. The



1 1 1

vector may be used in vitro, for example of the production of RNA corresponding to the cDNA, or used to transfect or transfect a host cell.

A further embodiment of the present invention provides host cells transformed with the vectors for the replication and expression of the cDNA of the invention, including the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO. 2, 3, 5, 7, 8, 10, 12, 13 or 15 or the open reading frame thereof. The cells will be chosen to be compatible with the vector and may for example be bacterial, yeast, insect or mammalian.

A further embodiment of the present invention provides a method of producing a polypeptide which comprises culturing host cells of the present invention under conditions effective to express a polypeptide of the invention. Preferably, in addition, such a method is carried out under conditions in which the polypeptide of the invention is expressed and then produced from the host cells.

cDNA of the present invention may also be inserted into the vectors described above in an antisense orientation in order to provide for the production of antisense RNA. Such antisense RNA may be used in a method of controlling the levels of a polypeptide of the invention in a cell.

The invention also provides monoclonal or polyclonal antibodies against a polypeptide of the invention. The invention further provides a process for the production of monoclonal or polyclonal antibodies to the polypeptides of the invention. Monoclonal antibodies may be prepared by common hybridoma technology using polypeptides of the invention or fragments thereof, as an immunogen. Polyclonal antibodies may also be prepared by common means which comprise inoculating host animals, for example a rat or a rabbit, with polypeptides of the invention and recovering immune serum.

The present invention also provides pharmaceutical compositions containing a polypeptide of the invention, or an antibody thereof, in



association with a pharmaceutically acceptable diluent and/or carrier.

The polypeptide of the present invention includes that which a part of their amino acid sequence is lacking (e.g., a polypeptide comprised of the only essential sequence for revealing a biological activity in an amino acid sequence shown in SEQ ID NO.1), that which a part of their amino acid sequence is replaced by other amino acids (e.g., those replaced by an amino acid having a similar property) and that which other amino acids are added or inserted into a part of their amino acid sequence, as well as those having the amino acid sequence shown in SEQ ID NO. 1, 4, 6, 9, 11 or 14.

As known well, there are one to six kinds of codon as that encoding one amino acid (for example, one kind of codon for Methioine (Met), and six kinds of codon for leucine (Leu) are known). Accordingly, the nucleotide sequence of cDNA can be changed in order to encode the polypeptide having the same amino acid sequence.

The DNA of the present invention, specified in (2) includes a group of every nucleotide sequences encoding polypeptides (1) shown in SEQ ID NO. 1, 4, 6, 9, 11 or 14. There is a probability that yield of a polypeptide is improved by changing a nucleotide sequence.

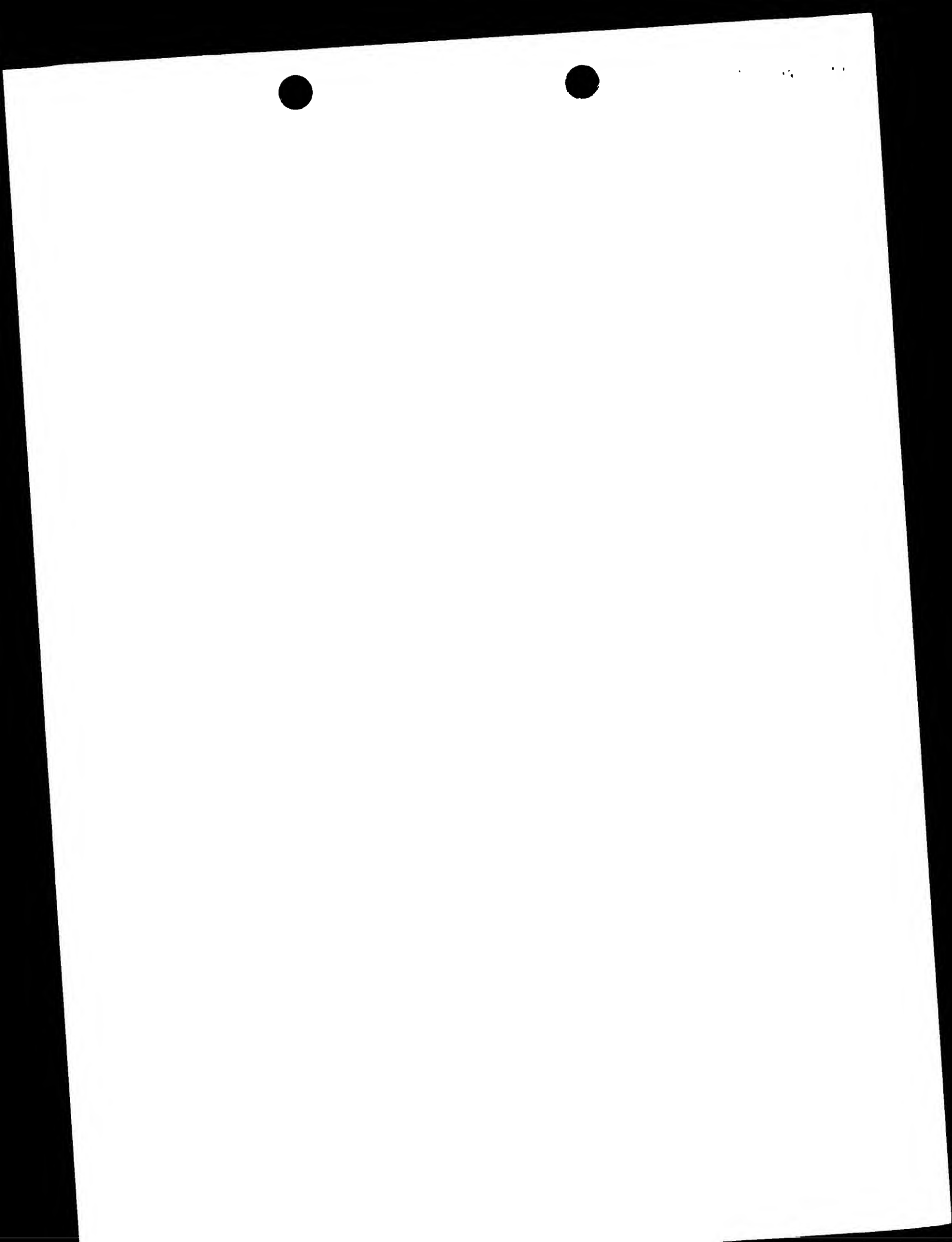
The cDNA specified in (3) is the embodiment of the cDNA shown in (2), and indicate the sequence of natural form.

The cDNA shown in (4) indicates the sequence of the cDNA specified in (3) with natural non-translational region.

cDNA carrying nucleotide sequence shown in SEQ ID NO. 3, 8 or 13 is prepared by the following method:

Brief description of Yeast SST method (see USP No. 5,536,637) is as follows.

Yeast such as *Saccharomyces cerevisiae* should secrete invertase into the medium in order to take sucrose or raffinose as a source of energy or



carbon.

(Invertase is an enzyme to cleave raffinose into sucrose and melibiose, sucrose into fructose and glucose.)

It is known that many known mammalian signal peptide make yeast secrete its invertase.

From these knowledge, SST method was developed as a screening method to find novel signal peptide which make it possible can to secrete yeast invertase from mammalian cDNA library. SST method uses yeast growth on raffinose medium as a marker. Non-secretory type invertase gene SUC2 (GENBANK Accession No. V 01311) lacking initiation codon ATG was inserted to yeast expression vector to prepare yeast SST vector pSUC2.

In this expression vector, ADH promoter, ADH terminator (both were derived from AAH5 plasmid (Gammerer, Methods in Enzymol. 101, 192-201, 1983)), 2u ori (as a yeast replication origin), TRP1 (as a yeast selective marker), ColE1 ori (as a E. Coli replication origin) and ampicillin resistance gene (as a drug resistance marker) were inserted.

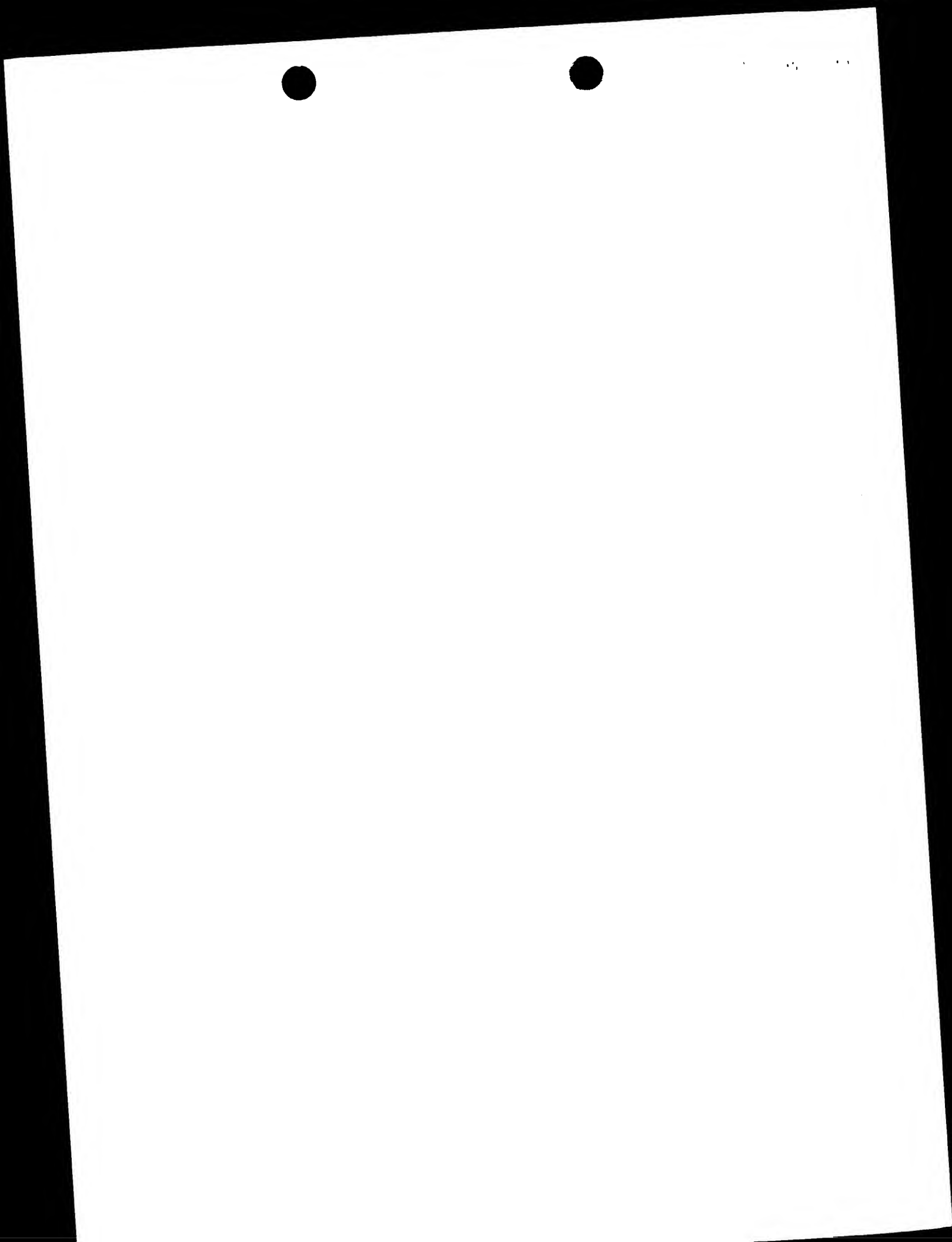
Mammalian cDNA was inserted into the upstream of SUC2 gene to prepare yeast SST cDNA library. Yeast lacking secretory type invertase, was transformed with this library.

If inserted mammalian cDNA encodes a signal peptide, yeast could be survive in raffinose medium as a result of restoring secretion of invertase.

Only to culture yeast colonies, prepare plasmids and determine the nucleotide sequence of the insert cDNAs, it is possible to identify novel signal peptide rapidly and easily.

Preparation of yeast SST cDNA library is as follows:

(1) mRNA is isolated from the targeted cells, second-strand synthesis is performed by using random primer with certain restriction enzyme (enzyme I) recognition site,





(2) double-strand cDNA is ligated to adapter containing certain restriction endonuclease (enzyme II) recognition site, differ from enzyme I, digested with enzyme I and fractionated in a appropriate size,

(3) obtained cDNA fragment is inserted into yeast expression vector on the upstream region of invertase gene which signal peptide is deleted and the library was transformed.

Detailed description of each step is as follows:

(1) mRNA is isolated from mammalian organs and cell lines stimulate them with appropriate stimulator if necessary) by known methods (Molecular Cloning (Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) or Current Protocol in Molecular Biology (F. M. Ausubel et al, John Wiley & Sons, Inc.) if not remark especially).

Mouse embryonic heart is chosen as a tissue source. Double-strand cDNA synthesis using random primer is performed by known methods.

Any sites may be used as restriction endonuclease recognition site I which is linked to adapter and restriction endonuclease recognition site II which is used in step (2), if both sites are different each other. Preferably, XhoI is used as enzyme I and EcoRI as enzyme II.

In step (2), cDNA is created blunt-ends with T4 DNA polymerase, ligated enzyme II adapter and digested with enzyme I. Fragment cDNA is analyzed with agarose-gel electrophoresis and is selected cDNA fraction ranging in size from 300 to 800 bp. As mentioned above, any enzyme may be used as enzyme II if it is not same the enzyme I.

In step (3), cDNA fragment obtained in step (2) is inserted into yeast expression vector on the upstream region of invertase gene which signal peptide is deleted. E. coli transformed with the expression vector. Many vectors are known as yeast expression plasmid vector. For example, YEp24 is also functioned in E. Coli. Preferably pSUC2 as described above is used.



Many host *E. Coli* strains are known for transformation, preferably DH103 competent cell is used. Any known transformation method is available, preferably it is performed by electroporation method. Transformant is cultured by known methods to obtain cDNA library for yeast SST method.

However not every All of the clones do not contain cDNA fragment. Further all of the gene fragments do not encode unknown signal peptides. It is therefore necessary to screen a gene fragment encoding for an unknown signal peptide from the library.

Therefore, screening of fragments containing a sequence encoding an appropriate signal peptide is performed by transformation of the cDNA library into *Saccharomyces cerevisiae* (e.g. Y455 strain) which lack invertase (it may be prepared by known methods.).

Transformation of yeast is performed by known methods, e.g. lithium acetate method. Transformant is cultured in a selective medium, then transferred to a medium containing raffinose as a carbon source. Survival colonies are selected and then prepared plasmid. Survival colonies on a raffinose-medium indicates that some signal peptide of secretory protein was inserted to this clone.

Isolated positive clones is determined the nucleotide sequence. As to a cDNA encodes unknown protein, full-length clone may be isolated by using cDNA fragment as a probe and then determined to obtain full-length nucleotide sequence. These manipulation is performed by known methods.

Once the nucleotide sequences shown in SEQ ID NO. 2, 5, 7, 10, 12 or 15 are determined partially or preferably fully, it is possible to obtain cDNA encode mammalian protein itself, homologue or subset of the invention. cDNA library or mRNA derived from mammals was screened by PCR with any synthesized oligonucleotide primers or by hybridization with any fragment as a probe. It is possible to obtain cDNA encodes other mammalian homologue



protein from other mammalian cDNA or genome library.

If a cDNA obtained above contains a nucleotide sequence of cDNA fragment obtained by SST (or consensus sequence thereof), it will be thought that the cDNA encodes signal peptide. So it is clear that the cDNA will be full-length or almost full.

(All signal peptides exist at N-termini of a protein and are encoded at 5'-temini of open reading frame of cDNA.)

The confirmation may be carried out by Northern analysis with the said cDNA as a probe. It is thought that the cDNA is almost complete length, if length of the cDNA is almost the same length of the mRNA obtained in the hybridizing band.

The present invention supplies full-length protein and also its mature protein sequence. The full-length protein sequence deduced from nucleotide sequences shown in SEQ ID NO. 2, 7 or 12.

Mature proteins are obtained by expressing full-length cDNAs shown in SEQ ID NO. 3, 8 or 13 in mammalian cells or other host cells.

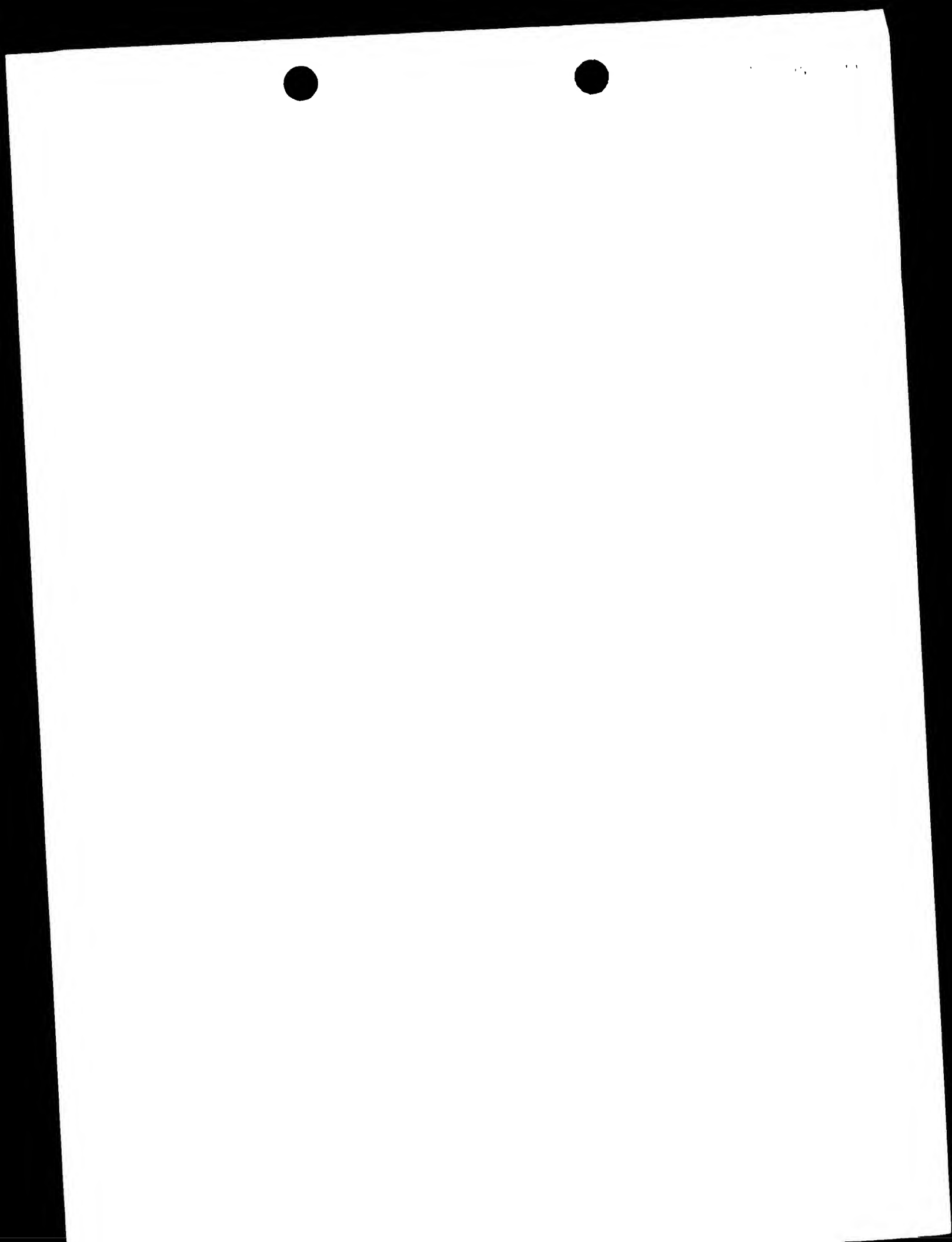
Mature protein sequences are deduced from their full-length amino acid sequences.

Once the nucleotide sequences shown in SEQ ID NOs. 2, 5, 7, 10, 12 or 15 are determined, cDNAs of the present invention are obtained by chemical synthesis, or by hybridization making use of nucleotide fragments which are chemically synthesized as a probe.

Furthermore, cDNAs of the present invention are obtained in desired amount by transforming a vector that contains the cDNA into a proper host, and culturing the transformant.

The polypeptides of the present invention may be prepared by:

- (1) isolating and purifying from an organism or a cultured cell,
- (2) chemically synthesizing, or



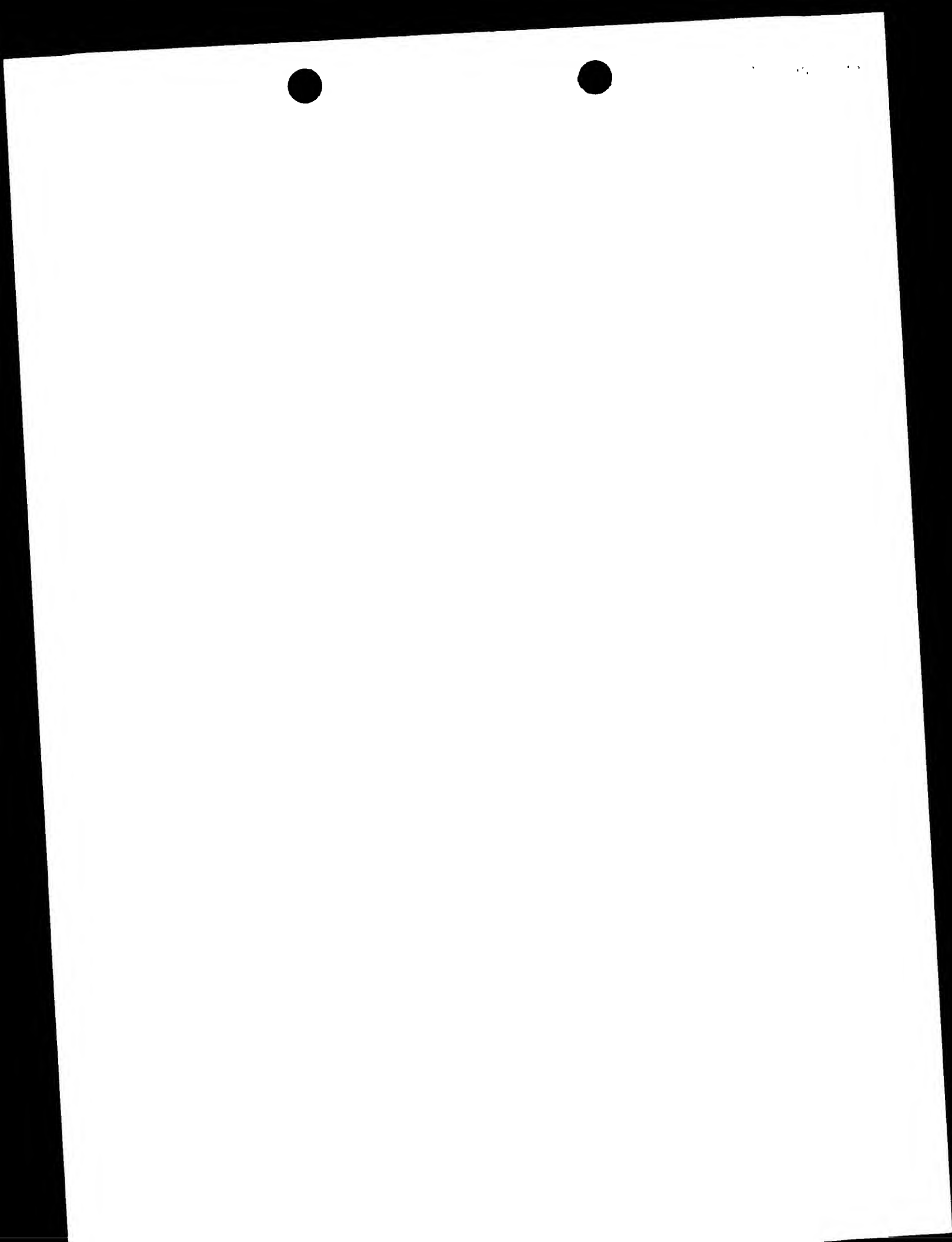
(3) using recombinant DNA technology, preferably, by the method described in (3) in industrial production.

Examples of expression system for (host-vector system) producing a polypeptide by using recombinant DNA technology are the expression systems of bacteria, yeast, insect cells and mammalian cells.

In the expression of the polypeptide, for example, in E. Coli, the expression vector is prepared by adding the initiation codon (ATG) to 5' end of a DNA encoding mature peptide, connecting the DNA thus obtained to the downstream of a proper promoter (e.g., trp promoter, lac promoter,  $\lambda$  PL promoter, T7 promoter etc.), and then inserting it into a vector (e.g., pBR322, pUC18, pUC19 etc.) which functions in an E. coli strain.

Then, an E. coli strain (e.g., E. coli DH1 strain, E. coli JM109 strain, E. coli HB101 strain, etc.) which is transformed with the expression vector described above may be cultured in a appropriate medium to obtain the desired polypeptide. When a signal peptide of bacteria (e.g., signal peptide of pel B) is utilized, the desired polypeptide may be also released in periplasm. Furthermore, a fusion protein with other polypeptide may be also produced easily.

In the expression of the polypeptide, for example, in a mammalian cells, for example, the expression vector is prepared by inserting the DNA encoding cDNA shown in SEQ ID NO. 3, 8 or 13 into the downstream of a proper promoter (e.g., SV40 promoter, LTR promoter, metallothionein promoter etc.) in a proper vector (e.g., retrovirus vector, papilloma virus vector, vaccinia virus vector, SV40 vector, etc.) a proper mammalian cell (e.g., monkey COS-7 cell, Chinese hamster CHO cell, mouse L cell etc.) is transformed with the expression vector thus obtained, and then the transformant is cultured in a proper medium to get a desired polypeptide in the culture medium. Further, fusion protein may be produced by linking cDNA fragment encoding other





polypeptide such as Fc portion of an antibody. The polypeptide thus obtained may be isolated and purified by conventional biochemical methods.

#### **Effect of the invention**

The polypeptides of the present invention and cDNA encoding them are expected to exhibit one or more of the uses or biological activities (including those associated with assays cited herein) identified below.

Uses or activities described for proteins of the present invention may be provided by administration or use of such proteins or by administration or use of cDNA encoding them (such as, for example, in gene therapies or vectors suitable for introduction of DNA).

We have been confirmed that the said polypeptide possess the suppressing activity on the differentiation of vascular smooth muscle cells.

Accordingly, the polypeptides may be useful for treatment of diseases related to abnormal proliferation of smooth muscle cells, for example, arteriosclerotic coronary disease, neointimal formation which results in restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty and myosarcoma.

But not limit the present invention:

<Cytokine activity and cell proliferation/differentiation activity>

The protein of the present invention may exhibit cytokine, cell proliferation (either inducing or inhibiting) or cell differentiation (either inducing or inhibiting) activity or may induce production of other cytokines in certain cell populations.

Many protein factors discovered to date, including all known cytokines, have exhibited activity in one or more factor dependent cell proliferation assays, and hence the assays serve as a convenient confirmation of cytokine activity.



The activity of a protein of the present invention is evidenced by any one of a number of routine factor dependent cell proliferation assays for cell lines.

<Immune stimulating/suppressing activity>

The protein of the present invention may also exhibit immune stimulating or immune suppressing activity. The protein may be useful in the treatment of various immune deficiencies and disorders (including severe combined immunodeficiency (SCID)), e.g., in regulating (up or down) growth and proliferation of T and/or B lymphocytes, as well as effecting the cytolytic activity of NK cells and other cell populations.

These immune deficiencies may be genetic or be caused by viral (e.g. HIV) as well as bacterial or fungal infections, or may result from autoimmune disorders.

More specifically, infectious diseases caused by viral, bacterial, fungal or other infection may be treatable using the protein of the present invention, including infections by HIV, hepatitis viruses, herpes viruses, mycobacteria, leishmania, malaria and various fungal infections such as candida.

Of course, in this regard, a protein of the present invention may also be useful where a boost to the immune system generally would be indicated, i.e., in the treatment of cancer.

Such a protein of the present invention may also be useful in the treatment of allergic reactions and conditions, such as asthma or other respiratory problems.

The protein of the present invention may also suppress chronic or acute inflammation, such as, for example, that associated with infection (such as septic shock or systemic inflammatory response syndrome (SIRS)), inflammatory bowel disease, Crohn's disease or resulting from over production of cytokines such as TNF or IL-1 (such as the effect demonstrated by IL-



11).

<Hematopoiesis regulating activity>

The protein of the present invention may be useful in regulation of hematopoiesis and, consequently, in the treatment of myeloid or lymphoid cell deficiencies.

Even marginal biological activity in support of colony forming cells or of factor-dependent cell lines indicates involvement in regulating hematopoiesis.

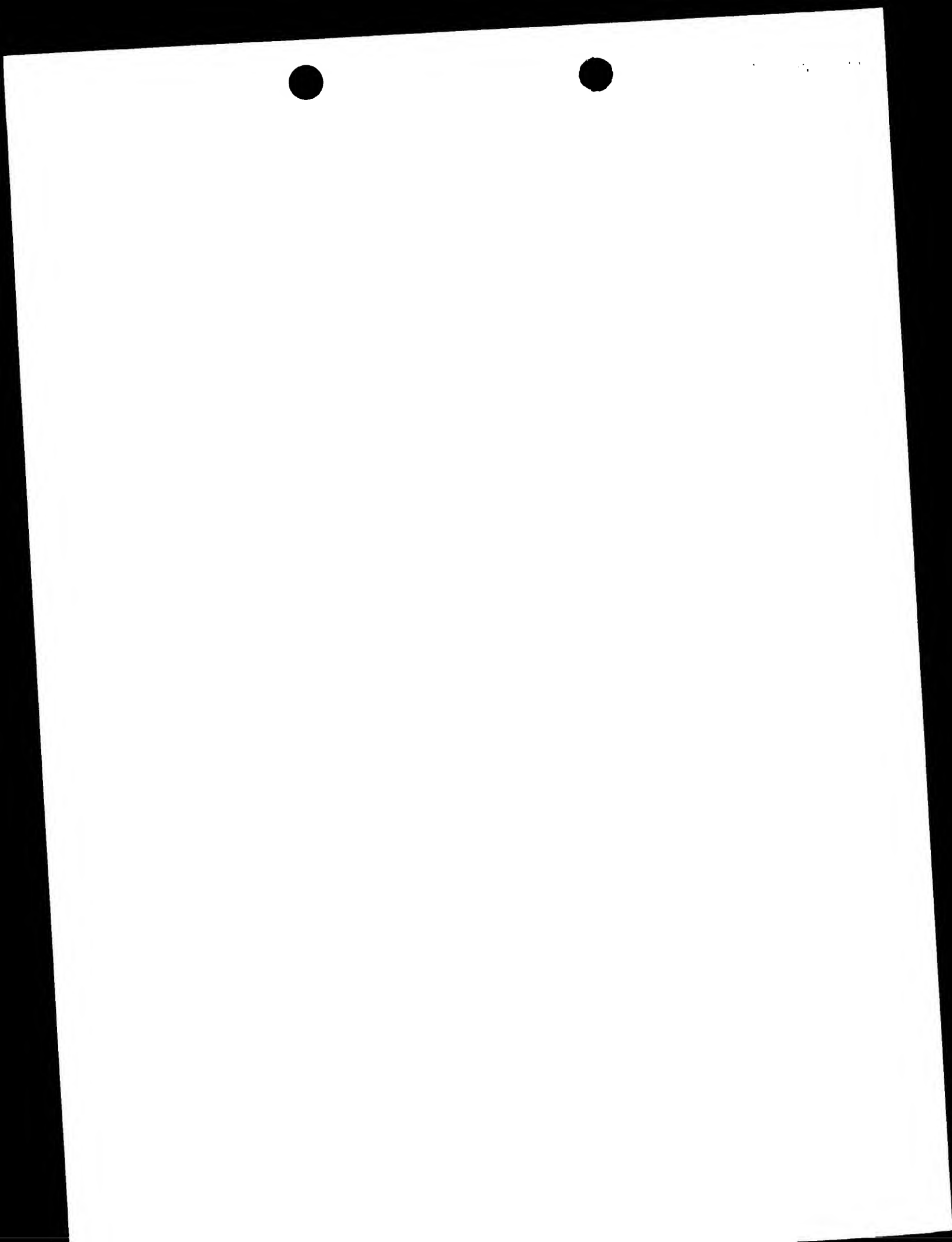
The said biological activities are concerned with the following all or some example(s).

e.g. in supporting the growth and proliferation of erythroid progenitor cells alone or in combination with other cytokines, thereby indicating utility. for example, in treating various anemias or for use in conjunction with irradiation/chemotherapy to stimulate the production of erythroid precursors and/or erythroid cells;

in supporting the growth and proliferation of myeloid cells such as granulocytes and monocytes/macrophages (i.e., traditional CSF activity) useful, for example, in conjunction with chemotherapy to prevent or treat consequent myelo-suppression;

in supporting the growth and proliferation of megakaryocytes and consequently of platelets thereby allowing prevention or treatment of various platelet disorders such as thrombocytopenia, and generally for use in place of or complimentary to platelet transfusions;

and/or in supporting the growth and proliferation of hematopoietic stem cells which are capable of maturing to any and all of the above-mentioned hematopoietic cells and therefore find therapeutic utility in various stem cell disorders (such as those usually treated with transplantation, including, without limitation, aplastic anemia and paroxysmal nocturnal



hemoglobinuria), as well as in repopulating the stem cell compartment post irradiation/chemotherapy, either in-vivo or ex-vivo (i.e. in conjunction with bone marrow transplantation) as normal cells or genetically manipulated for gene therapy.

Suitable assays for proliferation and differentiation of various hematopoietic lines are cited above.

The activity of a protein of the invention may, among other means, be measured by the following methods :

<Tissue generation/regeneration activity>

The protein of the present invention also may have utility in compositions used for bone, cartilage, tendon, Ligament and/or nerve tissue growth or regeneration, as well as for wound healing and tissue repair, and in the treatment of burns, incisions and ulcers.

The protein of the present invention, which induces cartilage and/or bone growth in circumstances where bone is not normally formed, has application in the healing of bone fractures and cartilage damage or defects in humans and other animals.

Such a preparation employing the protein of the invention may have prophylactic use in closed as well as open fracture reduction and also in the improved fixation of artificial joints.

De novo bone formation induced by an osteogenic agent contributes to the repair of congenital, trauma induced, or oncologic resection induced craniofacial defects, and also is useful in cosmetic plastic surgery.

The protein of this invention may also be used in the treatment of periodontal disease, and in other tooth repair processes. Such agents may provide an environment to attract bone-forming cells, stimulate growth of bone-forming cells or induce differentiation of progenitors of bone-forming cells.





The protein of the invention may also be useful in the treatment of osteoporosis or osteoarthritis, such as through stimulation of bone and/or cartilage repair or by blocking inflammation or processes of tissue destruction (collagenase activity, osteoclast activity, etc.) mediated by inflammatory processes.

Another category of tissue regeneration activity that may be attributable to the protein of the present invention is tendon/ligament formation. A protein of the present invention, which induces tendon/ligament-like tissue or other tissue formation in circumstances where such tissue is not normally formed, has application in the healing of tendon or ligament tears, deformities and other tendon or ligament defects in humans and other animals.

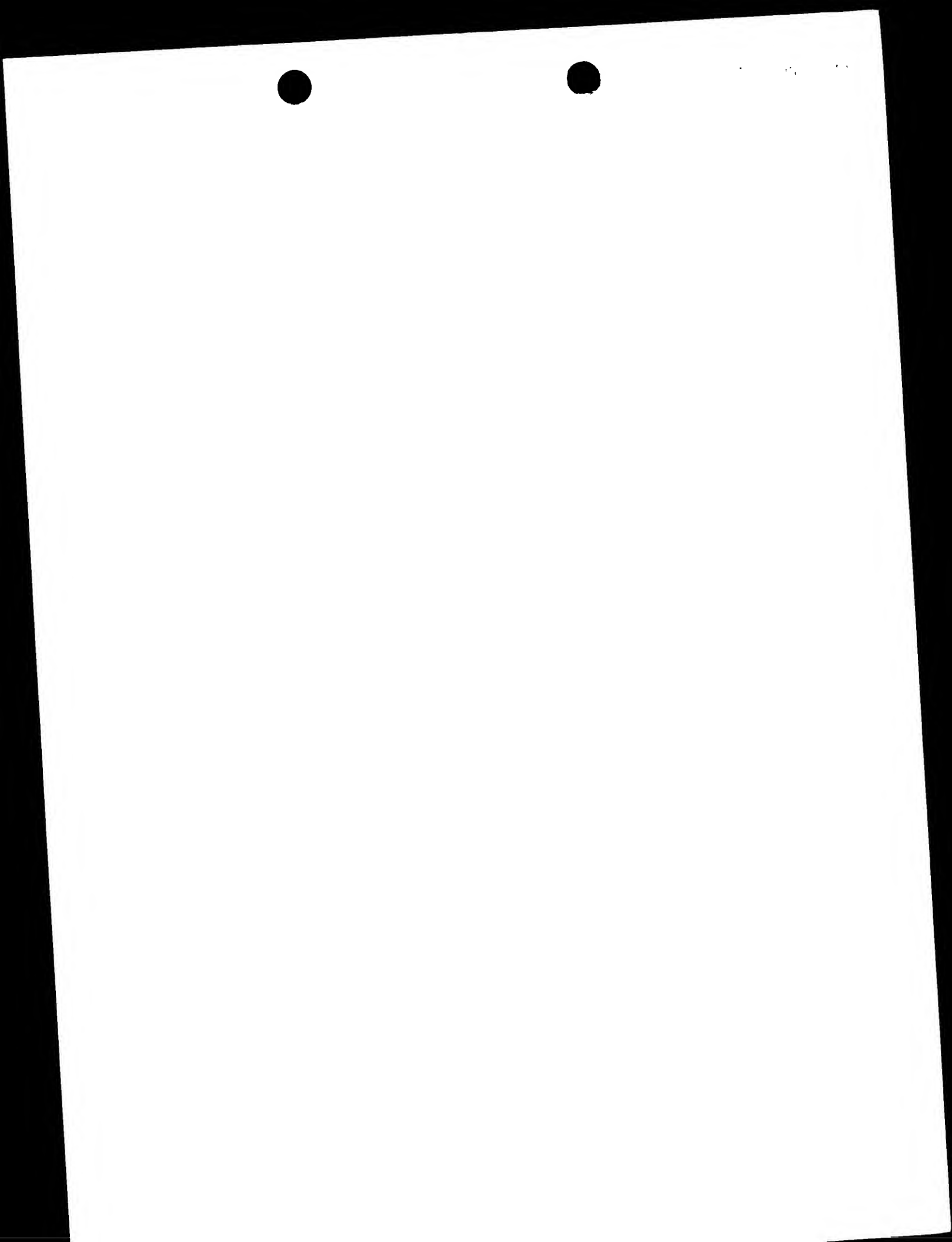
Such a preparation employing a tendon/Ligament-like tissue inducing protein may have prophylactic use in preventing damage to tendon or ligament tissue, as well as use in the improved fixation of tendon or ligament to bone or other tissues, and in repairing defects to tendon or ligament tissue.

De novo tendon/ligament-like tissue formation induced by a composition of the present invention contributes to the repair of congenital, trauma induced, or other tendon or ligament defects of other origin, and is also useful in cosmetic plastic surgery for attachment or repair of tendons or ligaments.

The compositions of the present invention may provide an environment to attract tendon- or ligament-forming cells, stimulate growth of tendon- or ligament-forming cells, induce differentiation of progenitors of tendon- or ligament-forming cells, or induce growth of tendon Ligament cells or progenitors ex vivo for return in vivo to effect tissue repair.

The compositions of the invention may also be useful in the treatment of tendinitis, carpal tunnel syndrome and other tendon or ligament defects.

The compositions may also include an appropriate matrix and/or sequestering



agent as a carrier as is well known in the art.

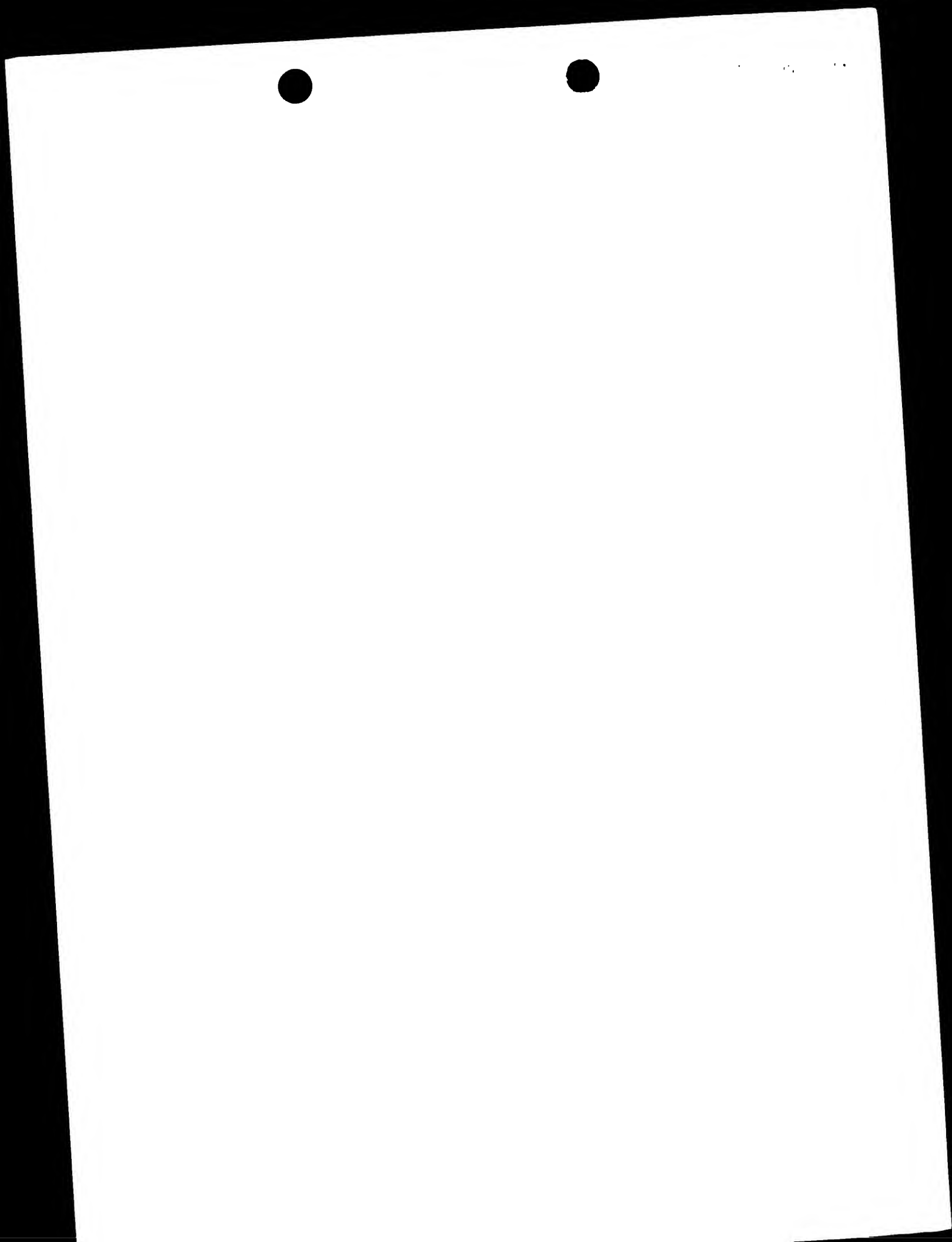
The protein of the present invention may also be useful for proliferation of neural cells and for regeneration of nerve and brain tissue. i.e. for the treatment of central and peripheral nervous system diseases and neuropathies. as well as mechanical and traumatic disorders, which involve degeneration, death or trauma to neural cells or nerve tissue. More specifically, a protein may be used in the treatment of diseases of the peripheral nervous system, such as peripheral nerve injuries, peripheral neuropathy and localized neuropathies, and central nervous system diseases, such as Alzheimer's, Parkinson's disease, Huntington's disease, amyotrophic lateral sclerosis, and Shy-Drager syndrome.

Further conditions which may be treated in accordance with the present invention include mechanical and traumatic disorders, such as spinal cord disorders, head trauma and cerebrovascular diseases such as stroke. Peripheral neuropathies resulting from chemotherapy or other medical therapies may also be treatable using a protein of the invention.

It is expected that the protein of the present invention may also exhibit activity for generation of other tissues, such as organs (including, for example, pancreas, liver, intestine, kidney, skin, endothelium), muscle (smooth, skeletal or cardiac) and vascular (including vascular endothelium) tissue, or for promoting or suppressing the proliferation of cells comprising such tissues. Part of the desired effects may be by inhibition of fibrotic scarring to allow normal tissue to regenerate.

A protein of the present invention may also be useful for gut protection or regeneration and treatment of lung or liver fibrosis, reperfusion injury in various tissues, and conditions resulting from systemic cytokine damage.  
<Activin/Inhibin activity>

The protein of the present invention may also exhibit activin- or



inhibin-related activities. Inhibins are characterized by their ability to inhibit the release of follicle stimulating hormone (FSH), while activins and are characterized by their ability to stimulate the release of follicle stimulating hormone (FSH).

Thus, a protein of the present invention, alone or in heterodimers with a member of the inhibin \*a family, may be useful as a contraceptive based on the ability of inhibins to decrease fertility in female mammals and decrease spermatogenesis in male mammals. Administration of sufficient amounts of other inhibins can induce infertility in these mammals.

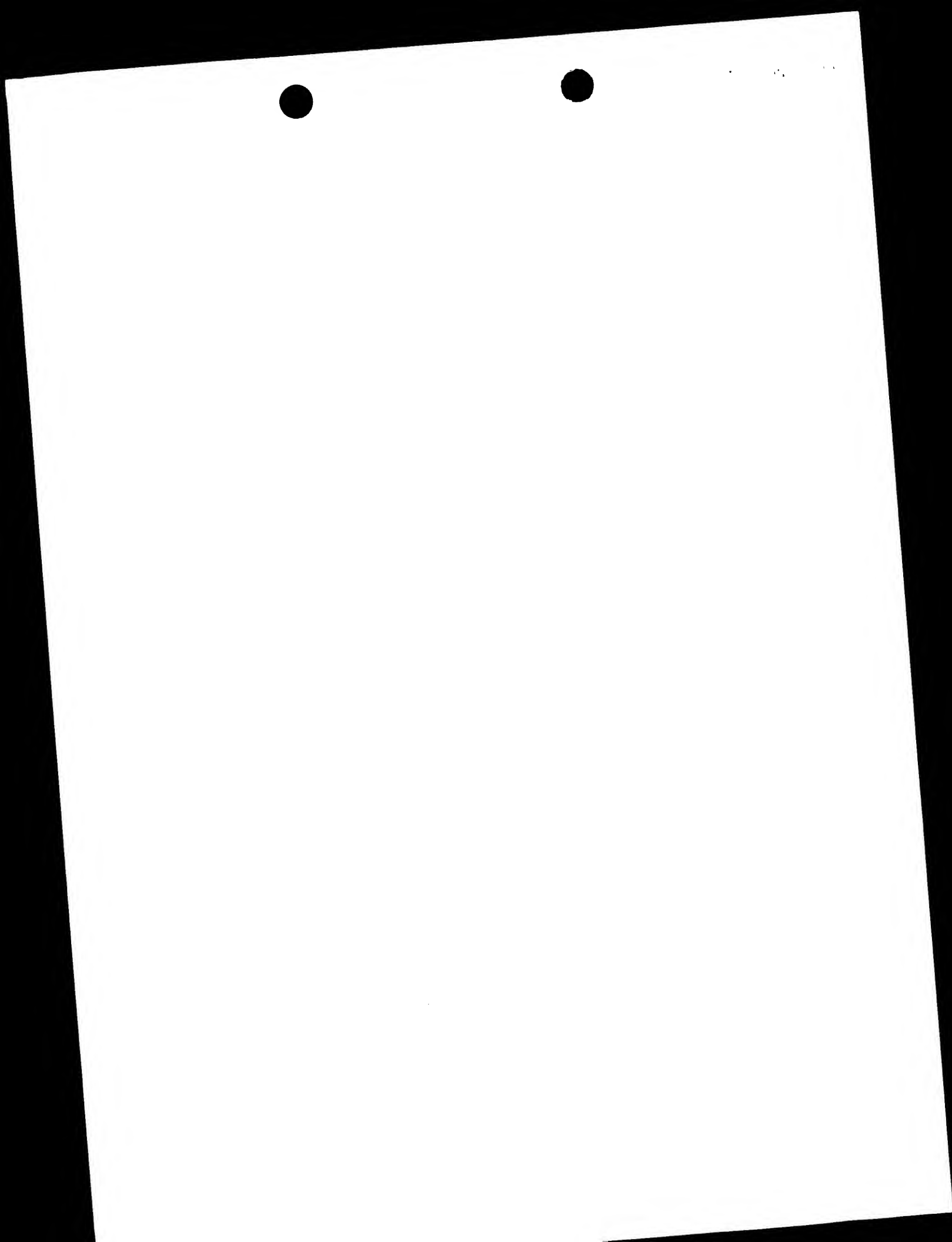
Alternatively, the protein of the invention, as a homodimer or as a heterodimer with other protein subunits of the inhibin-\*b group, may be useful as a fertility inducing therapeutic, based upon the ability of activin molecules in stimulating FSH release from cells of the anterior pituitary.

See for example, USP 4,798,885. The polypeptide of the invention may also be useful for advancement of the onset of fertility in sexually immature mammals, so as to increase the lifetime reproductive performance of domestic animals such as cows, sheep and pigs.

#### <Chemotactic/chemokinetic activity>

A protein of the present invention may have chemotactic or chemokinetic activity (e.g., act as a chemokine) for mammalian cells, including, for example, monocytes, neutrophils, T-cells, mast cells, eosinophils and/or endothelial cells.

Chemotactic and chemokinetic proteins can be used to mobilized or attract a desired cell 'population to a desired site of action. Chemotactic or chemokinetic proteins provide particular advantages in treatment of wounds and other trauma to tissues, as well as in treatment of localized infections. For example, attraction of lymphocytes, monocytes or neutrophils to tumors or sites of infection may result in improved immune responses against the



tumor or infecting agent.

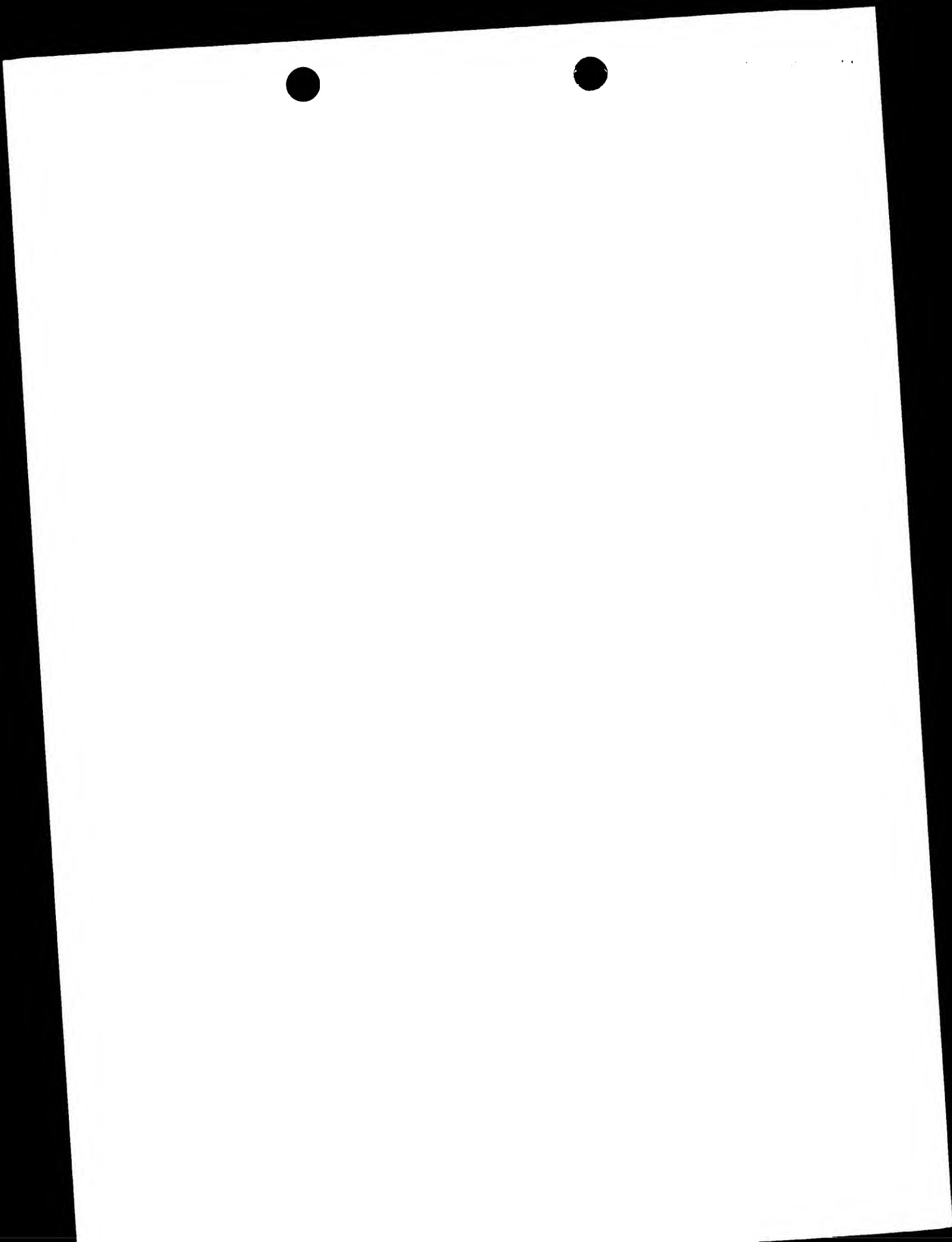
A protein or peptide has chemotactic activity for a particular cell population if it can stimulate, directly or indirectly, the directed orientation or movement of such cell population. Preferably, the protein or peptide has the ability to directly stimulate directed movement of cells. Whether a particular protein has chemotactic activity for a population of cells can be readily determined by employing such protein or peptide in any known assay for cell chemotaxis.

<Hemostatic and thrombolytic activity>

The protein of the invention may also exhibit hemostatic or thrombolytic activity. As a result, such a protein is expected to be useful in treatment of various coagulation disorders (including hereditary disorders, such as hemophilias) or to enhance coagulation and other hemostatic events in treating wounds resulting from trauma, surgery or other causes. A protein of the invention may also be useful for dissolving or inhibiting formation of thromboses and for treatment and prevention of conditions resulting therefrom (such as, for example, infarction or stroke).

<Receptor/ligand activity>

The protein of the present invention may also demonstrate activity as receptors, receptor ligands or inhibitors or agonists of receptor/ligand interactions. Examples of such receptors and ligands include, without limitation, cytokine receptors and their ligands, receptor kinases and their ligands, receptor phosphatases and their ligands, receptors involved in cell-cell interactions and their ligands (including without limitation, cellular adhesion molecules (such as selectins, integrins and their ligands) and receptor/ligand pairs involved in antigen presentation, antigen recognition and development of cellular and humoral immune responses). Receptors and ligands are also useful for screening of potential peptide





or small molecule inhibitors of the relevant receptor/ligand interaction. A protein of the present invention (including, without limitation, fragments of receptors and ligands) may themselves be useful as inhibitors of receptor/ligand interactions.

#### <Nutritional uses>

Proteins of the present invention can also be used as nutritional sources or supplements. Such uses include without limitation use as a protein or amino acid supplement, use as a carbon source, use as a nitrogen source and use as a source of carbohydrate. In such cases the protein of the present invention can be added to the feed of a particular organism or can be administered as a separate solid or liquid preparation, such as in the form of powder, pills, solutions, suspensions or capsules. In the case of microorganisms, the protein of the invention can be added to the medium in or on which the microorganism is cultured.

#### <Cadherin/Tumor invasion suppresser activity>

Cadherins are calcium-dependent adhesion molecules that appear to play major roles during development, particularly in defining specific cell types. Loss or alteration of normal cadherin expression can lead to changes in cell adhesion properties linked to tumor growth and metastasis.

Cadherin malfunction is also implicated in other human diseases, such as pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus (autoimmune blistering skin diseases), Crohn's disease, and some developmental abnormalities.

The cadherin superfamily includes well over forty members, each with a distinct pattern of expression. All members of the superfamily have in common conserved extracellular repeats (cadherin domains), but structural differences are found in other parts of the molecule.

The cadherin domains bind calcium to form their tertiary structure and thus calcium is required to mediate their adhesion. Only a few amino acids in

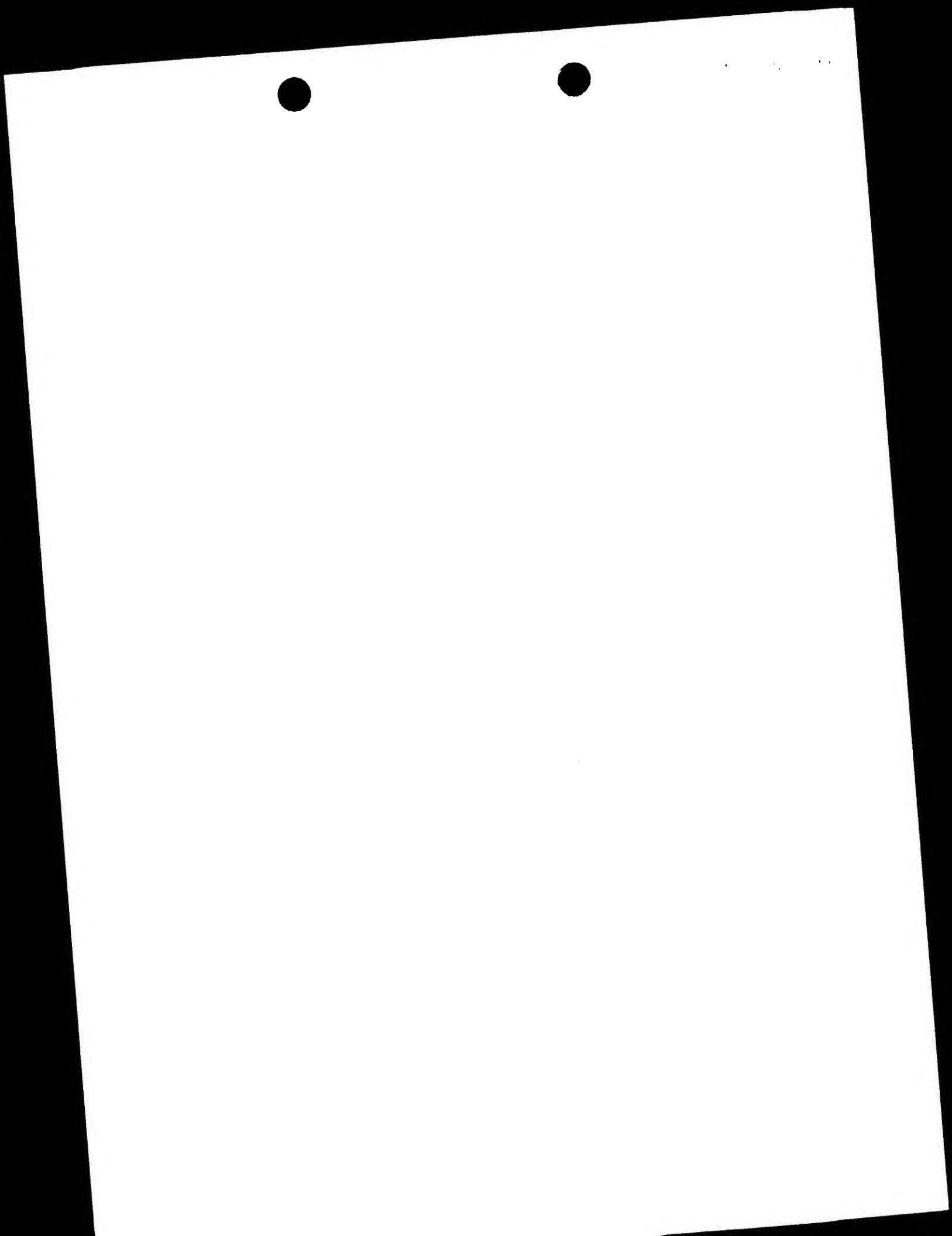


the first cadherin domain provide the basis for homophilic adhesion; modification of this recognition site can change the specificity of a cadherin so that instead of recognizing only itself, the mutant molecule can now also bind to a different cadherin. In addition, some cadherins engage in heterophilic adhesion with other cadherin.

E-cadherin, one member of the cadherin superfamily, is expressed in epithelial cell types. Pathologically, if E-cadherin expression is lost in a tumor, the malignant cells become invasive and the cancer metastasizes. Transfection of cancer cell line with cDNAs expressing E-cadherin has reversed cancer-associated changes by returning altered cell shapes to normal, restoring cells adhesiveness to each other and to their substrate, decreasing the cell growth rate, and drastically reducing anchorage-independent cell growth.

Thus, reintroducing E-cadherin expression reverts carcinomas to a less advanced stage. It is likely that other cadherins have the same invasion suppresser role in carcinomas derived from other tissue types. Therefore, proteins of the present invention with cadherin activity, and cDNAs of the present invention encoding such proteins, can be used to treat cancer. Introducing such proteins or cDNAs into cancer cells can reduce or eliminate the cancerous change observed in these cells by providing normal cadherin expression.

Cancer cells have also been shown to express cadherins of a different tissue type than their origin, thus allowing these cells to invade and metastasize in a different tissue in the body. Proteins of the present invention with cadherin activity, and cDNAs of the present invention encoding such proteins, can be substituted in these cells for the inappropriately expressed cadherins, restoring normal cell adhesive properties and reducing or eliminating the tendency of the cells to metastasize.



Additionally, proteins of the present invention with cadherin activity, and cDNA of the present invention encoding such proteins, can be used to generate antibodies recognizing and binding to cadherins.

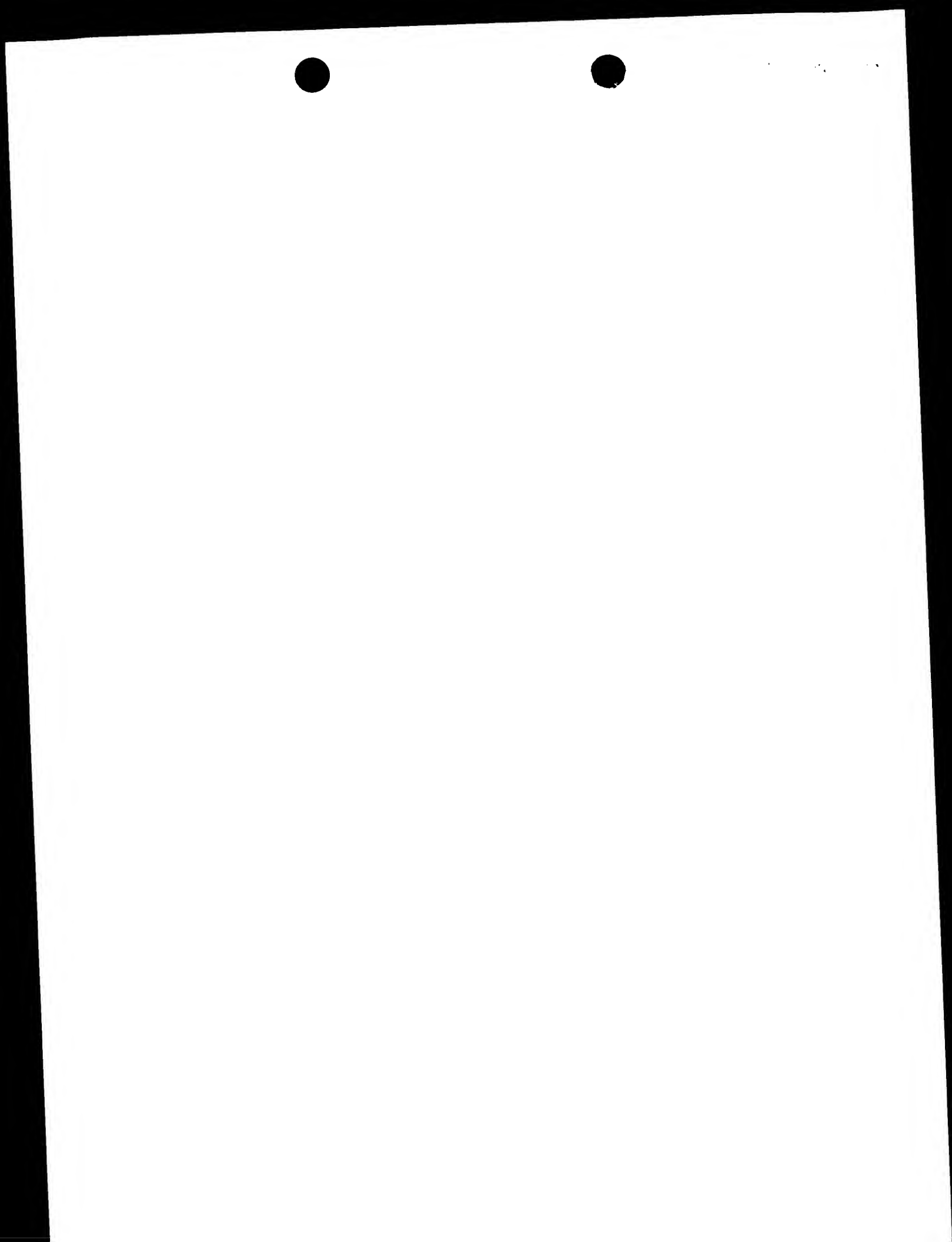
Such antibodies can be used to block the adhesion of inappropriately expressed tumor-cell cadherins, preventing the cells from forming a tumor elsewhere. Such an anti-cadherin antibody can also be used as a marker for the grade, pathological type, and prognosis of a cancer, i.e. the more progressed the cancer, the less cadherin expression there will be, and this decrease in cadherin expression can be detected by the use of a cadherin-binding antibody.

Fragments of proteins of the present invention with cadherin activity, preferably a polypeptide comprising a decapeptide of the cadherin recognition site, and cDNAs of the present invention encoding such protein fragments, can also be used to block cadherin function by binding to cadherins and preventing them from binding in ways that produce undesirable effects. Additionally, fragments of proteins of the present invention with cadherin activity, preferably truncated soluble cadherin fragments which have been found to be stable in the circulation of cancer patients, and polynucleotides encoding such protein fragments, can be used to disturb proper cell-cell adhesion.

#### <Tumor Inhibiting activity>

In addition to the activities described above for immunological treatment or prevention of tumors, the protein of the invention may exhibit other anti-tumor activities. The protein may inhibit tumor growth directly or indirectly (such as, for example, via ADCC).

The protein may exhibit its tumor inhibitory activity by acting on tumor tissue or tumor precursor tissue, by inhibiting formation of tissues necessary to support tumor growth (such as, for example, by inhibiting angiogenesis), by causing production of other factors, agents or cell types



which inhibit tumor growth, or by suppressing, eliminating or inhibiting factors, agents or cell types which promote tumor growth.

<Other activity>

The protein of the invention may also exhibit one or more of the following additional activities or effects: inhibiting the growth, infection or function of, or killing, infectious agents, including, bacteria, viruses, fungi and other parasites;

effecting (suppressing or enhancing) bodily characteristics, including, height, weight, hair color, eye color, skin, fat to lean ratio or other tissue pigmentation, or organ or body part size or shape (such as, for example, breast augmentation or diminution);

effecting elimination of dietary fat, protein, carbohydrate;

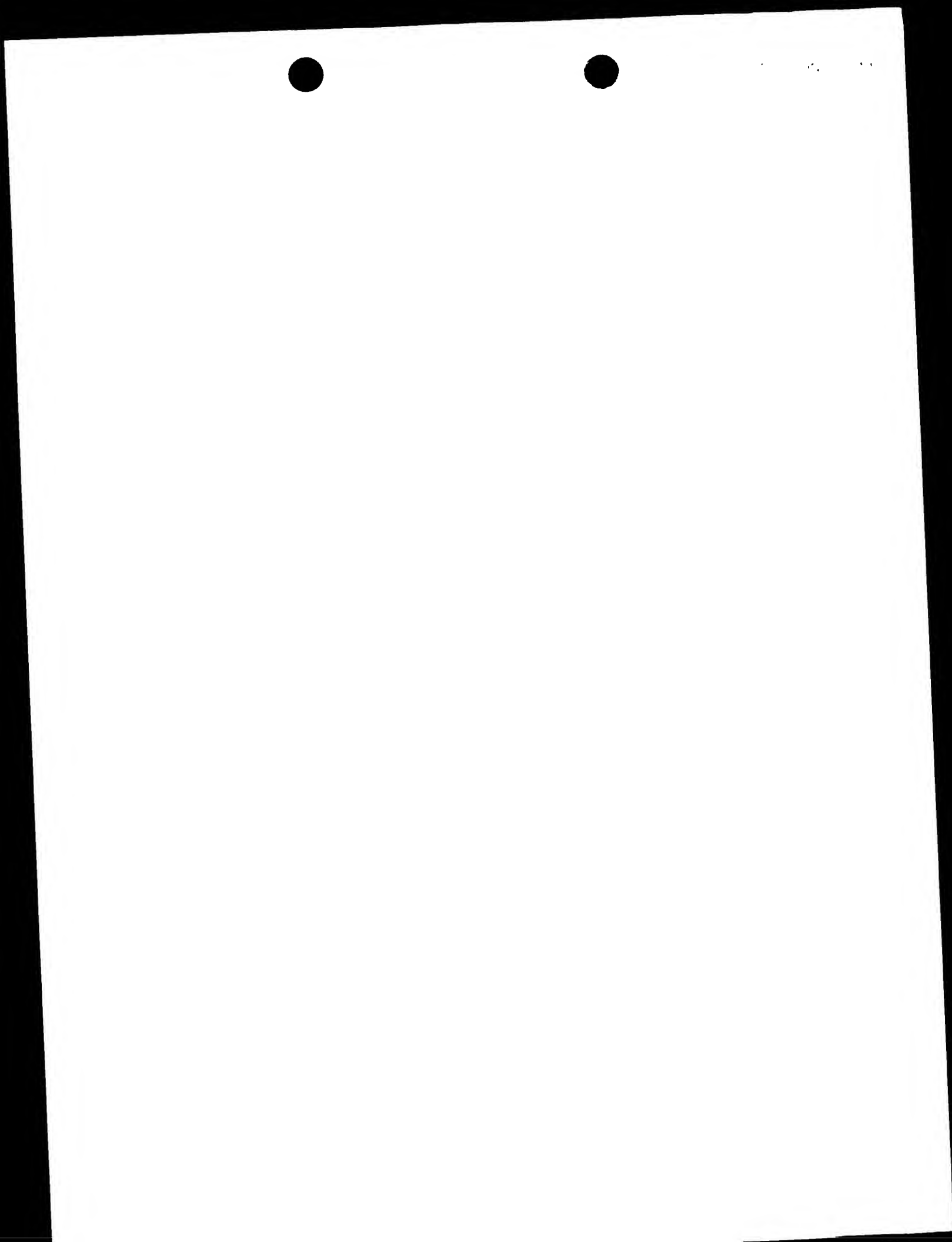
effecting behavioral characteristics, including appetite, libido, stress, cognition (including cognitive disorders), depression and violent behaviors;

providing analgesic effects or other pain reducing effects;

promoting differentiation and growth of embryonic stem cells in lineages other than hematopoietic lineages;

in the case of enzymes, correcting deficiencies of the enzyme and treating deficiency-related diseases.

The polypeptide with above activities, is suspected to have following functions by itself or interaction with its ligands or receptors or association with other molecules. For example, proliferation or cell death of B cells, T cells and/or mast cells or class specific induction of B cells by promotion of class switch of immunoglobulin genes; differentiation of B cells to antibody-forming cells; proliferation, differentiation, or cell death of precursors of granulocytes; proliferation, differentiation, or cell death of precursors of monocytes-macrophages;

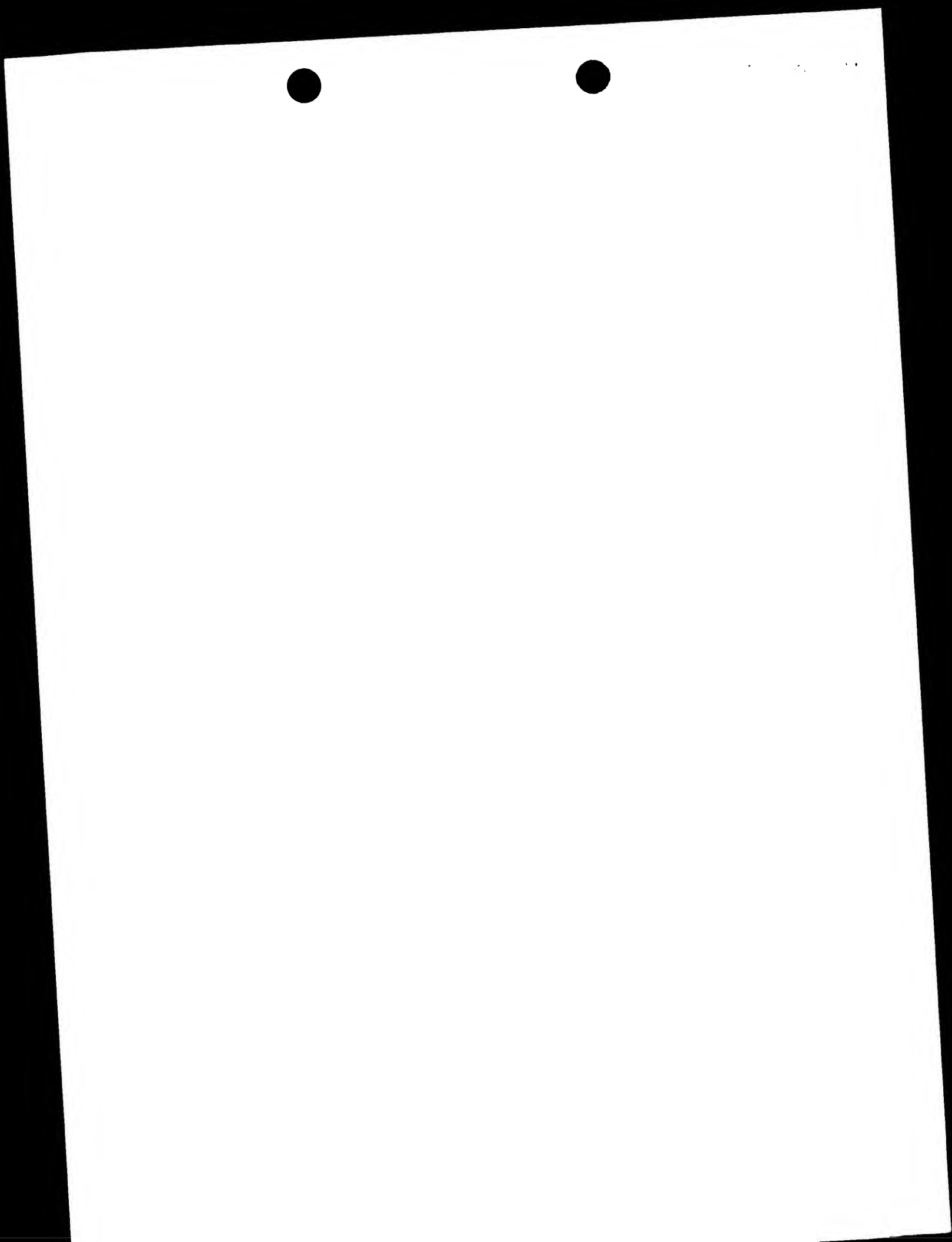




proliferation, of up regulation or cell death of neutrophils, monocytes-macrophages, eosinophils and/or basophils; proliferation, or cell death of precursors of megakaryocytes; proliferation, differentiation, or cell death of precursors of neutrophils; proliferation, differentiation, or cell death of precursors of T cells and B cells; promotion of production of erythrocytes; sustainment of proliferation of erythrocytes, neutrophils, eosinophils, basophils, monocytes-macrophages, mast cells, precursors of megakaryocyte ; promotion of migration of neutrophils, monocytes-macrophages, B cells and/or T cells; proliferation or cell death of thymocytes; suppression of differentiation of adipocytes; proliferation or cell death of natural killer cells; proliferation or cell death of hematopoietic stem cells; suppression of proliferation of stem cells and each hematopoietic precursor cells; promotion of differentiation from mesenchymal stem cells to osteoblasts or chondrocytes, proliferation or cell death of mesenchymal stem cells, osteoblasts or chondrocytes and promotion of bone absorption by activation of osteoclasts and promotion of differentiation from monocytes to osteoclasts.

This peptide is also suspected to function to nervous system, so expected to have functions below; differentiation to kinds of neurotransmitter-responsive neurons, survival or cell death of these cells; promotion of proliferation or cell death of glial cells; spread of neural dendrites; survival or cell death of gangriocytes; proliferation, promotion of differentiation, or cell death of astrocytes; proliferation or survival of peripheral neurons; proliferation or cell death of Schwann cells; proliferation, survival or cell death of motoneurons.

Furthermore, in the process of development of early embryonic, this polypeptide is expected to promote or inhibit the organogenesis of epidermis, brain, backbone, and nervous system by induction of ectoderm, that of



notochord connective tissues(bone, muscle, tendon), hemocytes, heart, kidney, and genital organs by induction of mesoderm, and that of digestive apparatus (stomach, intestine, liver, pancreas), respiratory apparatus (lung, trachea) by induction of endoderm. In adult, also, this polypeptide is thought to proliferate or inhibit the above organs.

Therefore, this polypeptide itself is expected to be used as an agent for the prevention or treatment of disease of progression or suppression of immune, nervous, or bone metabolic function, hypoplasia or overgrowth of hematopoietic cells: inflammatory disease (rheumatism, ulcerative colitis, etc.), decrease of hematopoietic stem cells after bone marrow transplantation, decrease of leukocytes, platelets, B-cells, or T-cells after radiation exposure or chemotherapeutic dosage against cancer or leukemia, anemia, infectious disease, cancer, leukemia, AIDS, bone metabolic disease(osteoporosis etc.), arteriosclerosis, various degenerative disease (Alzheimer's disease, multiple sclerosis, etc.), or nervous lesion.

In addition, since this polypeptide is thought to induce the differentiation or growth of organs derived from ectoderm, mesoderm, and endoderm, this polypeptide is expected to be an agent for tissue repair (epidermis, bone, muscle, tendon, heart, kidney, stomach, intestine, liver, pancreas, lung, and trachea, etc.).

Quantitation of this polypeptide in the body can be performed using polyclonal or monoclonal antibodies against this polypeptide. It can be used the study of relationship between this polypeptide and disease or diagnosis of disease, and so on. Polyclonal and monoclonal antibodies can be prepared using this polypeptide or its fragment as an antigen by known method.

Identification, purification or molecular cloning of known or unknown proteins which bind this polypeptide can be performed using this polypeptide by, for example, preparation of the affinity-column.



Identification of the molecules which interact with this polypeptide and molecular cloning of the gene can be performed by west-western method using this polypeptide or by yeast two-hybrid system using the cDNA (preferably cDNA encoding this polypeptide).

Agonists/antagonists of this receptor polypeptide and inhibitors between receptor and signal transduction molecules can be screened using this polypeptide.

For example, the screening can be carried out the following method.

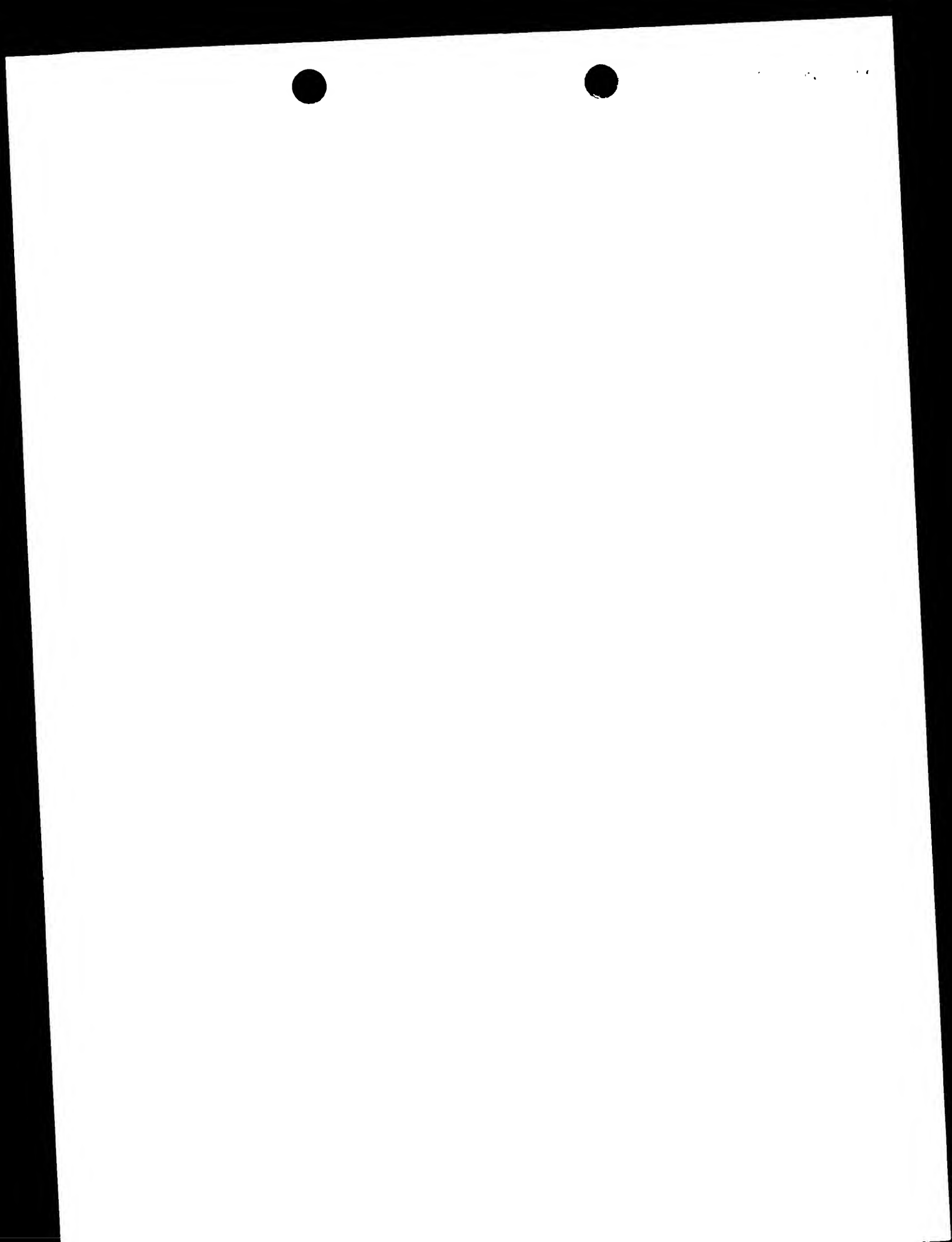
a) The reaction mixtures, which contain this polypeptide, screening compound and the cells, are incubated under the condition which the cells are normally stimulated by this peptide. (The reaction mixtures also contain the labeled compound, which is introduced into the cells according to the cell proliferation, and peptide which allow to observe the function of this peptide efficiently.)

b) Decision that the compounds are efficient agonists/antagonists or not, are performed by measurement of cell proliferation ability.

More detailed methods are followed:

Rat vascular muscle cell line (ATCC CRL-1444 or CRL1476) is cultured in 96 well plate with 10%FBS for 24 hours. Then the culture medium are replaced to the serum-free medium supplemented with each several concentrations of human PDGF-BB. At that time compounds to screen as well as A55 protein are added in the medium when screening the antagonists of A55 protein. While, compounds alone are added in the medium when screening the agonists of A55 protein. After 24 hours incubation, these cells are pulsed for 4 hours with 3H-thymidine. By measuring the 3H-thymidine incorporation, it is possible to determine whether the compounds have inhibitory or stimulatory effect on the A55 activity.

cDNAs of the present invention are useful not only the important and



essential template for the production of the polypeptide of the present invention which is expected to be largely useful, but also be useful for diagnosis or therapy (for example, treatment of gene lacking, treatment to stop the expression of the polypeptide by antisense DNA (RNA)).

Genomic DNA may be isolated with the cDNA of the present invention, as a probe. As the same manner, a human gene encoding which can be highly homologous to the cDNA of the present invention, that is, which encodes a polypeptide highly homologous to the polypeptide of the present invention and a gene of animals excluding mouse which can be highly homologous to the cDNA of the present invention, also may be isolated.

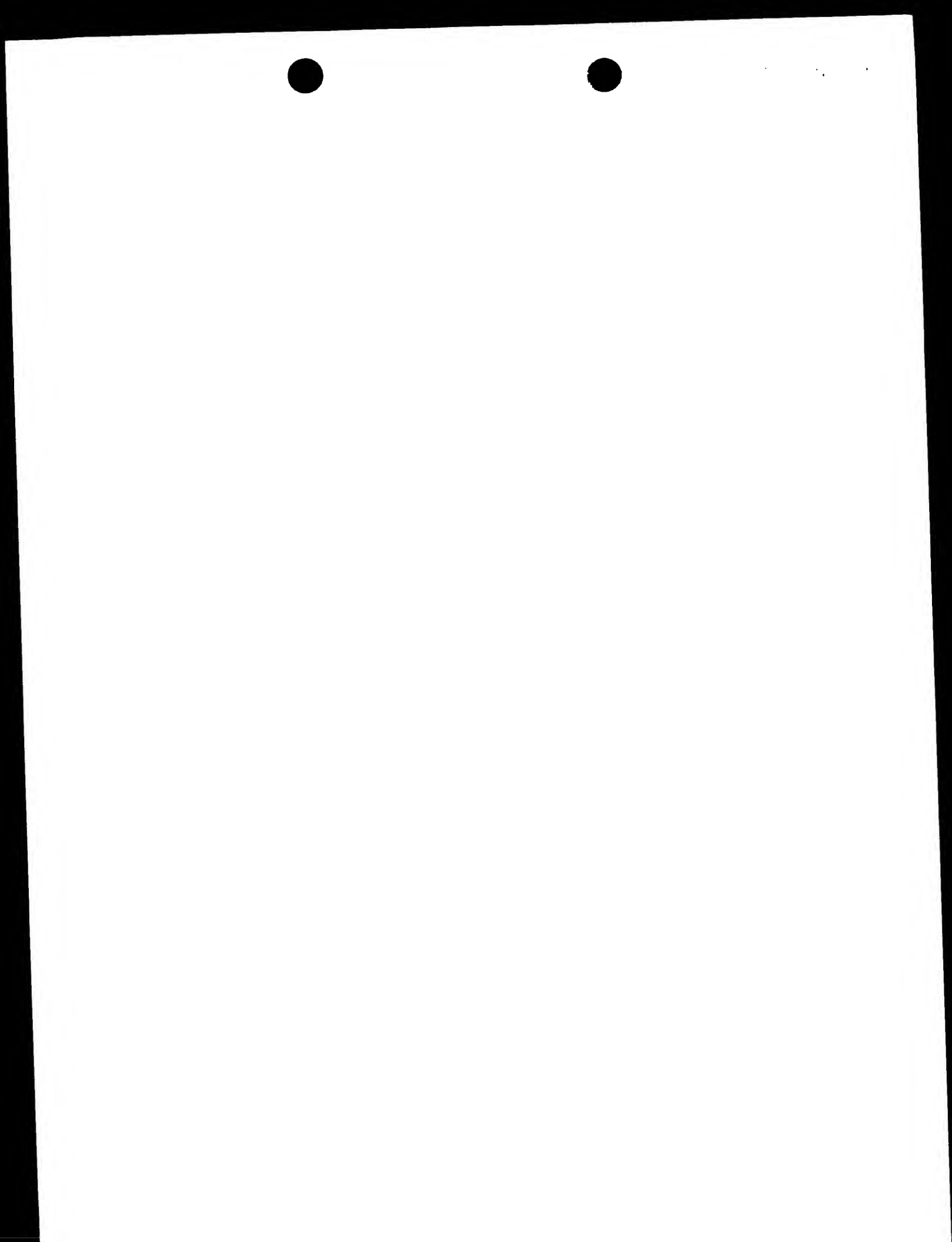
#### **Application for Pharmaceuticals**

For the medical treatment for diseases described above, the polypeptide of the invention or the antibody of the polypeptide of the invention may be administered systemically or partially in most cases, usually by oral or parenteral administration, preferably orally, intravenously or intraventricularly.

The doses to be administered depend upon age, body weight, symptom, desired therapeutic effect, route of administration, and duration of the treatment etc. In human adults, one dose per person is generally between 100  $\mu$ g and 100 mg, by oral administration, up to several times per day, and between 10  $\mu$ g and 100 mg, by parenteral administration up to several times per day.

As mentioned above, the doses to be used depend upon various conditions. Therefore, there are cases in which doses lower than or greater than the ranges specified above may be used.

The compounds of the present invention, may be administered as solid compositions, liquid compositions or other compositions for oral





administration, as injections, liniments or suppositories etc. for parenteral administration.

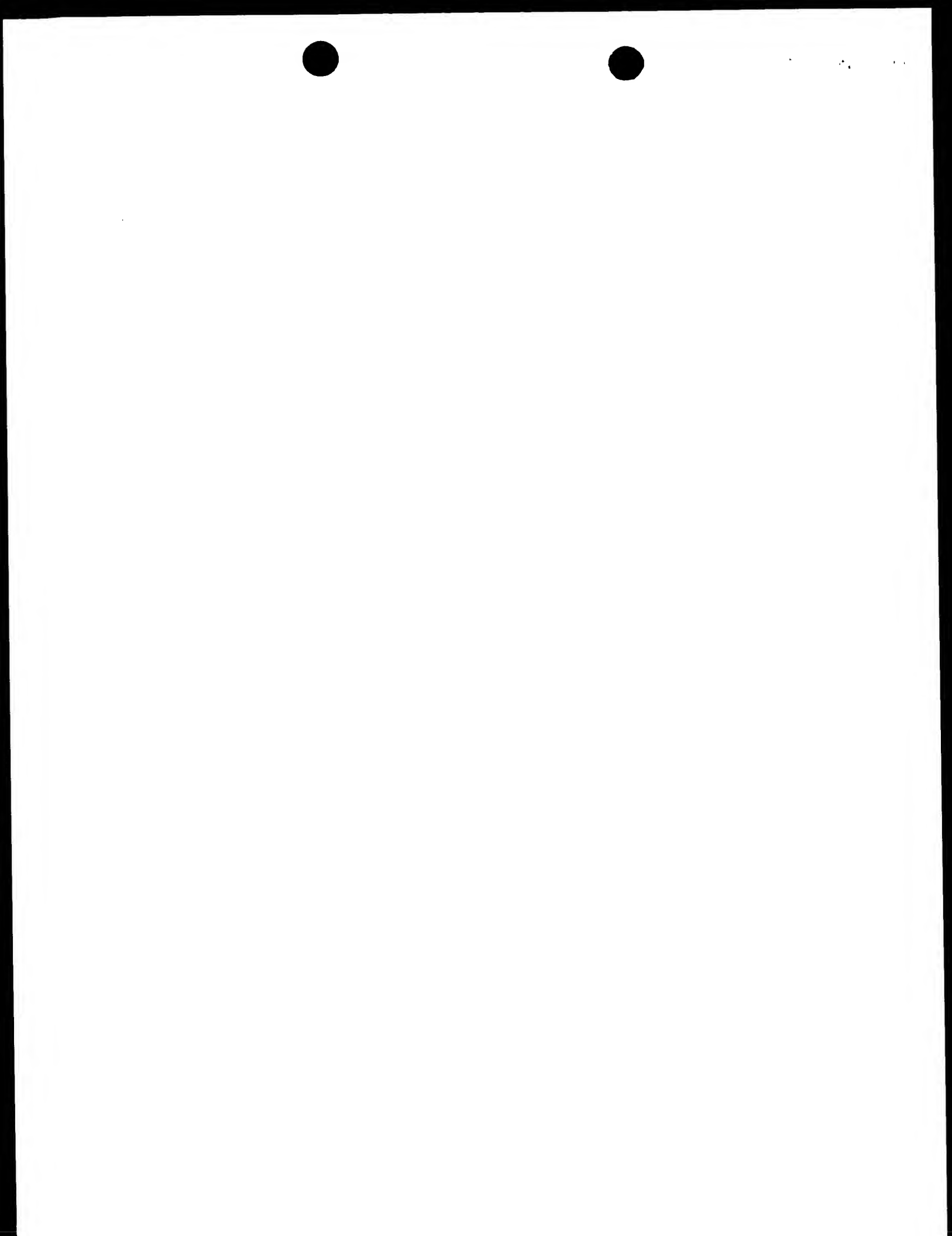
Solid compositions for oral administration include compressed tablets, pills, capsules, dispersible powders, granules. Capsules include soft or hard capsules.

In such compositions, one or more of the active compound(s) is or are admixed with at least one inert diluent (such as lactose, mannitol, glucose, hydroxypropyl cellulose, microcrystalline cellulose, starch, polyvinylpyrrolidone, magnesium metasilicate aluminate, etc.). The compositions may also comprise, as is normal practice, additional substances other than inert diluents: e.g. lubricating agents (such as magnesium stearate etc.), disintegrating agents (such as cellulose calcium glycolate, etc.), stabilizing agents (such as human serum albumin, lactose etc.), and assisting agents for dissolving (such as arginine, asparaginic acid etc.).

The tablets or pills may, if desired, be coated with a film of gastric or enteric materials (such as sugar, gelatin, hydroxypropyl cellulose or hydroxypropylmethyl cellulose phthalate, etc.), or be coated with more than two films. And then, coating may include containment within capsules of absorbable materials such as gelatin.

Liquid compositions for oral administration include pharmaceutically-acceptable emulsions, solutions, syrups and elixirs. In such compositions, one or more of the active compound(s) is or are contained in inert diluent(s) commonly used (purified water, ethanol etc.). Besides inert diluents, such compositions may also comprise adjuvants (such as wetting agents, suspending agents, etc.), sweetening agents, flavoring agents, perfuming agents, and preserving agents.

Other compositions for oral administration include spray compositions which may be prepared by known methods and which comprise one or more of



the active compound(s). Spray compositions may comprise additional substances other than inert diluents: e.g. stabilizing agents (sodium sulfite etc.), isotonic buffer (sodium chloride, sodium citrate, citric acid, etc.). For preparation of such spray compositions, for example, the method described in the United States Patent No. 2,868,691 or 3,095,355 (herein incorporated in their entireties by reference) may be used.

Injections for parenteral administration include sterile aqueous or non-aqueous solutions, suspensions and emulsions. In such compositions, one or more active compound(s) is or are admixed with at least one inert aqueous diluent(s) (distilled water for injection, physiological salt solution, etc.) or inert non-aqueous diluents(s) (propylene glycol, polyethylene glycol, olive oil, ethanol, POLYSOLBATE 80 TM , etc.).

Injections may comprise additional compound other than inert diluents: e.g. preserving agents, wetting agents, emulsifying agents, dispersing agents, stabilizing agent (such as human serum albumin, lactose, etc.), and assisting agents such as assisting agents for dissolving (arginine, asparaginic acid, etc.).

#### **Examples:**

The following examples concerning clone A55 are illustrated, but not limit the present invention.

##### **Example 1**

##### **Preparation of poly(A)+RNA**

Total RNA was prepared from mouse day18.5 embryonic heart by TRIzol reagent (Trade Mark, GIBCOBRL), and poly (A)<sup>+</sup> RNA was purified from the total RNA by mRNA Purification Kit (Trade Mark, Pharmacia).



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100

## Example 2

### Preparation of yeast SST cDNA library

Double strand cDNA was synthesized by SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (brand name, GIBCOBRL) with above poly(A)+RNA as template and random 9mer as primer which was containing XhoI site:

5'-CGA TTG AAT TCT AGA CCT GCC TCG AGN NNN NNN NN-3'

cDNA was ligated EcoRI adapter by DNA ligation kit ver.2 (trade name, Takara Shuzo; this kit was used in all ligating steps hereafter.) and digested by XhoI. cDNAs were separated by agarose-gel electrophoresis. 300 - 800 bp cDNAs were isolated and were ligated to EcoRI/NotI site of pSUC2 (see US 5,536,637). E. Coli DH10B strain were transformed by pSUC2 with electroporation to obtain yeast SST cDNA library.

## Example 3

### Screening by SST method and DNA sequencing of positive clone

Plasmids of the cDNA library were prepared. Yeast YTK12 strain were transformed by the plasmids with lithium acetate method (Current Protocols In Molecular Biology 13.7.1). The transformed yeast were plated on triptphan-free medium (CMD-Try medium) for selection. The plate was incubated for 48 hour at 30 oC. Replica of the colony which is obtained by Accutran Replica Plater (trade name, Schleicher & Schuell) were place YPR plate containing raffinose for carbon source, and the plate was incubated for 14 days at 30 oC.

After 3 days, each colony appeared was streaked on YPR plate again. The plates were incubated for 48 hours at 30 oC. Single colony was inoculated to YPR medium and was incubated for 48 hours at 30 oC. Then plasmids were prepared.



Insert cDNA was amplified by PCR with two kind primers which exist end side of cloning site on pSUC2 (sense strand primers were biotinylated). Biotinylated single strand of cDNAs were purified with Dynabeads (trade name, DYNAL) and determined the nucleotide sequences.

Sequencing was performed by Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction with DNA Sequencing kit (trade name, Applied Biosystems Inc.) and sequence was determined by DNA sequencer 373 (Applied Biosystems Inc.). All sequencing hereafter was carried with this method.

The clone named A55 is not registered on databases by homology search of cDNA sequence and deduced amino acid sequence and so it is cleared that the sequence is novel one. So, we tried to isolate clone full-length cDNA of the fragment of A55 clone (hereafter A55 SST fragment cDNA). We confirmed that A55 SST fragment cDNA contains signal peptide by comparison with known peptide which has signal peptide in view of function and structure.

#### Example 4

##### Cloning and sequencing of a full-length cDNA of A55

Phage particles of a cDNA library of mouse day13 embryonic heart (uni-ZAP XR, Stratagene) were transfected to E. coli XL1-Blue MRF\* host cells (Stratagene). Obtained one million plaques were transferred to nylon membranes. The membranes were hybridized with <sup>32</sup>P-labeled mouse A55 SST fragment cDNA as a probe. Many positive plaques were obtained.

From one positive plaque the phage particles containing a cloned insert were prepared, and were subjected to conversion into phagemid particles (pBluescript SK(-)) by co-infection of E. coli XL1-Blue MRF\* host cells (Stratagene) with ExAssist helper phage (Stratagene). The phagemid particles were transfected to E. coli DH5a. The plasmids were prepared from the obtained transformants.

Nucleotide sequence of 5'-end of cDNA were determined to confirm the existence





of the sequences of SST fragment cDNA. And then full-length sequencing were performed to obtain SEQ ID NO.3.

An open reading frame was determined and translation region for amino acid sequence shown in SEQ ID NO. 2 and deduced full-length amino acid sequence shown in SEQ ID NO. 1 were obtained. Mature protein of the said polypeptide was deduced to 425 amino acids shown in SEQ ID NO. 3 (144..1418) or 423 amino acids shown in SEQ ID NO. 4. Translation region of SEQ ID NO. 4 is shown in SEQ ID NO. 5.

It was confirmed that there was no identical sequences to the DNA of the present invention by homology search program, BLASTN and FASTA against public nucleotide database. And it was also confirmed that there were no identical sequences to the polypeptide of the present invention (mouse A55 protein) by homologue search program, BLASTX, BLASTP and FASTA against amino acid database.

It is revealed that the polypeptide of the present invention, mouse A55 is novel secretion protein since the polypeptide have no trans-membrane region by hydrophobisity analysis of the amino acid sequence.

It was revealed that A55 protein contained six EGF like domains by motif search, so it was expected that clone A55 also possesses EGF family like activities. Significant homology were also recognized between the amino acid sequence of clone mouse A55 (1-448 AA region) and the one of human S1-5 (SwissProt Accession No. HSU03877) (1-387 AA region) by the comparison using BLASTX, BLASTP and FASTA. It was reported that human S1-5 was a secreted protein containing EGF like domain, was induced in fibroblasts by growth arrest, and stimulated DNA synthesis (Beata Lecka-Czernik et. al. Mol. Cell. Biol. 15, 120-128, 1995). Farther it was revealed that A55 protein was homologous to many proteins containing EGF-like domain.



#### Example 5

##### Isolation of isoform gene of mouse A55 protein

Initiation codon was determined by cloning of 5'-end cDNA by 5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends method using Marathon cDNA Amplification Kit (trade name, Clontech). Double stranded cDNA template was prepared from poly(A)+RNA of mouse embryonic heart tissue. Primer mA55-R1:

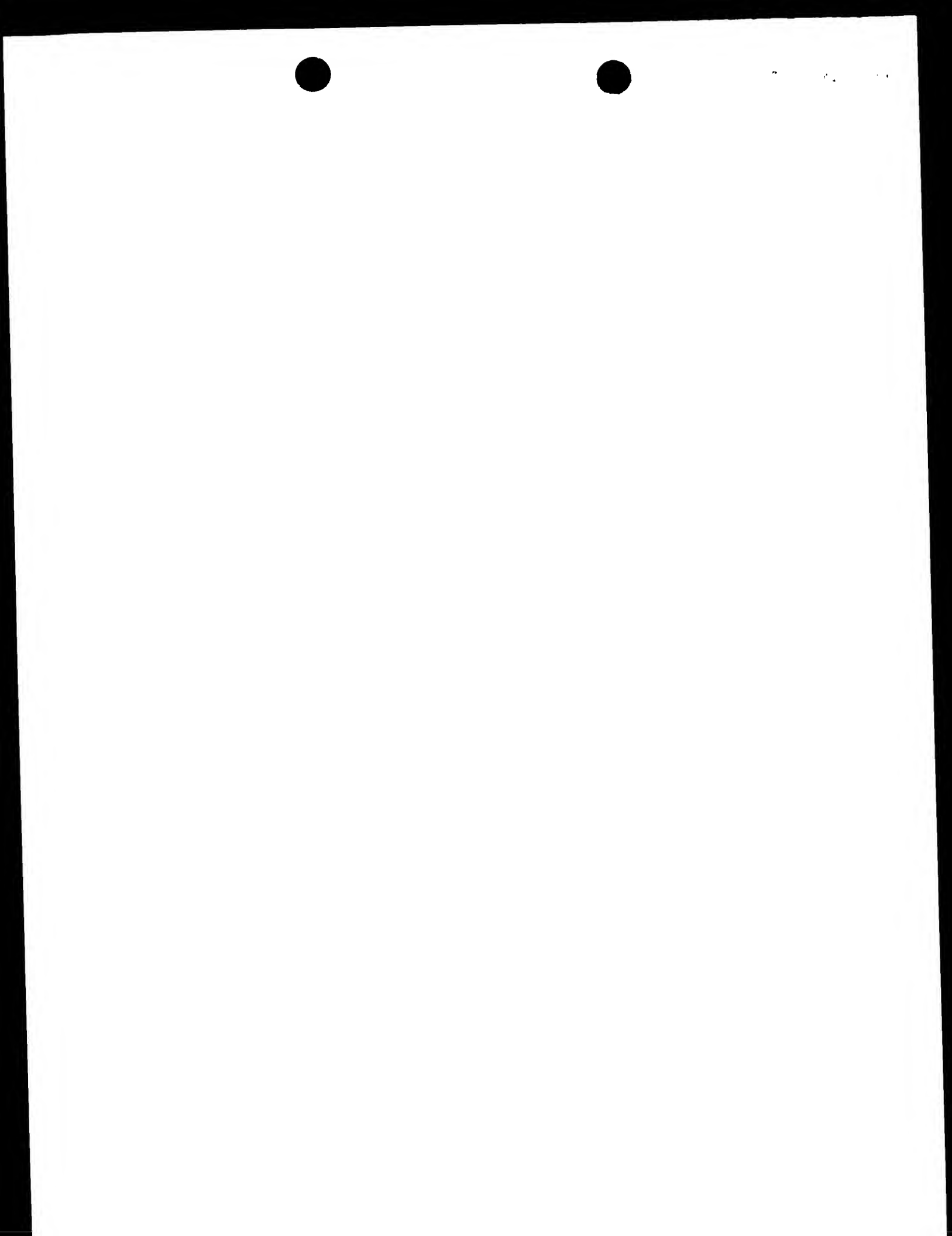
5'- CGT TTG TGC ACT GCT GCT GTG CAT TCC -3'

was prepared based on the information of full-length nucleotide sequences. PCR was performed with the said primer and adapter primer attached in the kit.

Amplified cDNA was separated with agarose-gel electrophoresis, and to pGEM-T Vector (trade name, Promega), ligated in and transformed to E. Coli DH5a and then plasmid was prepared. The full-length nucleotide sequences were determined. We found two deferent 5'-end sequences. One was identical to the clone containing the sequence in SEQ ID NO. 3, the other contained unknown sequence and no translational start site ATG (See SEQ ID NO. 7 and 8). The region defined from exon 1 of the clone was replaced by another exon which exists 400 bp downstream region of exon 1 was clarified by gene analysis. So it was cleared that the clone shown in SEQ ID NO. 8 was generated by alternative splicing of exon 1.

The clone encodes isoform protein shown in SEQ ID NO. 6 (6 amino acids in N termini of SEQ ID NO.1 was replaced by 19 amino acids in N termini of SEQ ID NO. 6).

The mature protein of this polypeptide was deduced 425 amino acids shown in SEQ ID NO. 8 (340...1614) or 423 amino acids shown in SEQ ID NO. 9. SEQ ID NO. 10 is the translational region of the polypeptide shown in SEQ ID



NO. 9.

#### Example 6

##### Determination of nucleotide sequence of human A55 gene

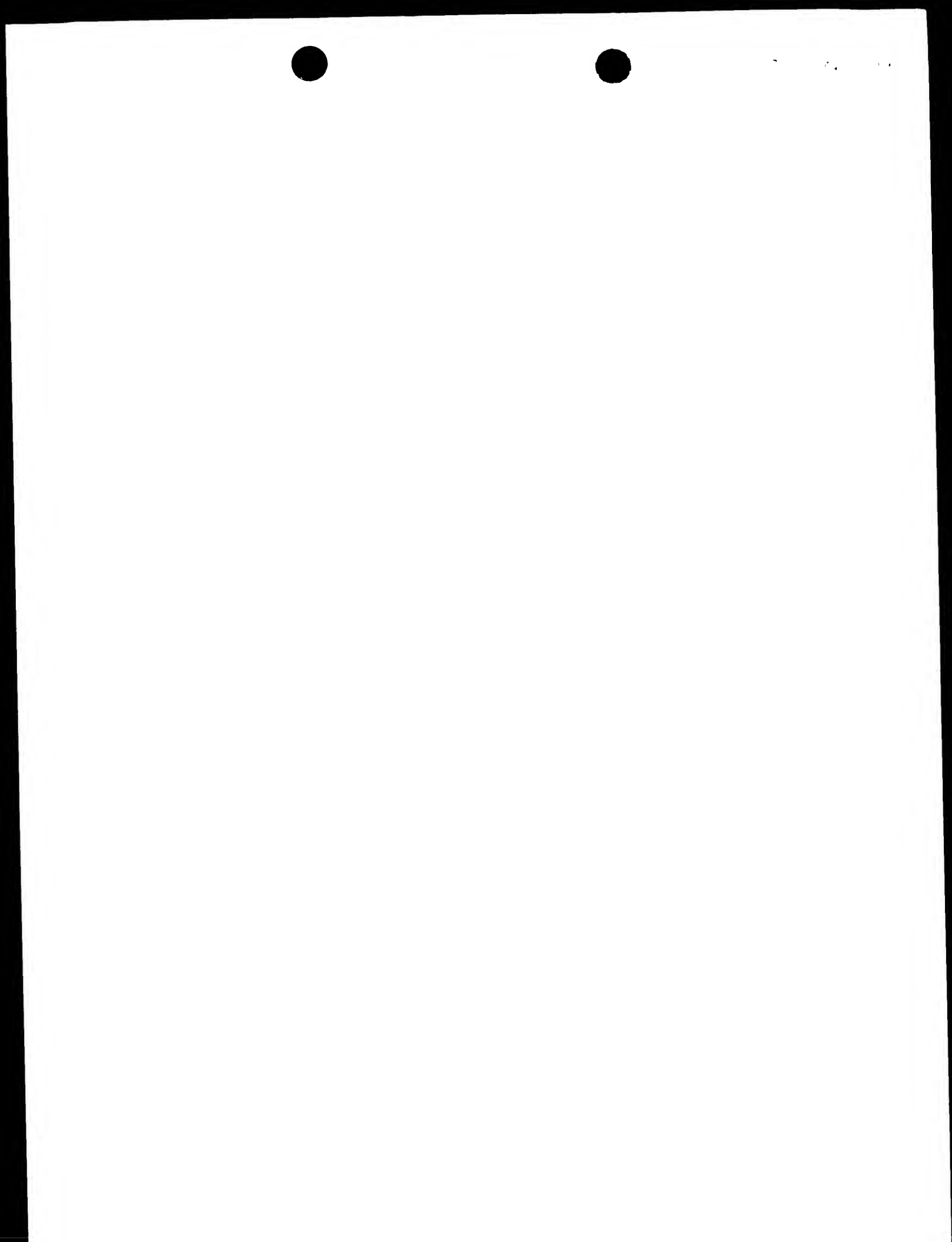
The present inventors found that Human EST sequence (GENBANK Accession No. H17726) homologous to 5'-end sequence of mouse A55 in the process of homology search shown in example 4.

And the present inventors buy the Clone ID 50483 derived from human brain cDNA library GENBANK Accession No. H17726 from American Type Culture Collection (ATCC). The full-length nucleotide sequence shown in SEQ ID NO. 13 was determined with the same manner as in the determination of mouse A55. Open reading frame was determined and translational region shown in SEQ ID NO. 12 and deduced amino acid sequence shown in SEQ ID NO. 11 were obtained. From above results, it is clarified that the human clone is full-length and have 89.3 % homology to mouse A55 at DNA level (translational region) and have 94.2 % homology to the one at amino acid level. It is suggested that the obtained human clone should be human counterpart of mouse A55.

(The clone was called human A55 hereafter.)

The mature protein of this polypeptide was deduced 425 amino acids shown in SEQ ID NO. 13 (238...1512) or 423 amino acids shown in SEQ ID NO. 14. Translational region of the polypeptide shown in SEQ ID NO. 14 shows in SEQ ID NO. 15.

It was confirmed that there was no identical sequences to the DNAs of the present invention by homology search program, BLASTN and FASTA against public nucleotide database. And it was also confirmed that there were no identical sequences to human A55 proteins by homologue search program, BLASTX, BLASTP and FASTA against amino acid database.



#### Example 7

##### Mouse A55 protein expression in mammalian cell

Mouse full-length cDNA shown in SEQ ID NO. 3 was inserted into expression vector for mammalian cell pNotS (Kaufman et al., Nucleic Acids Res. 19, 4485-4490 (1991)) and mouse A55 expression plasmid pNotS-mA55 was constructed.

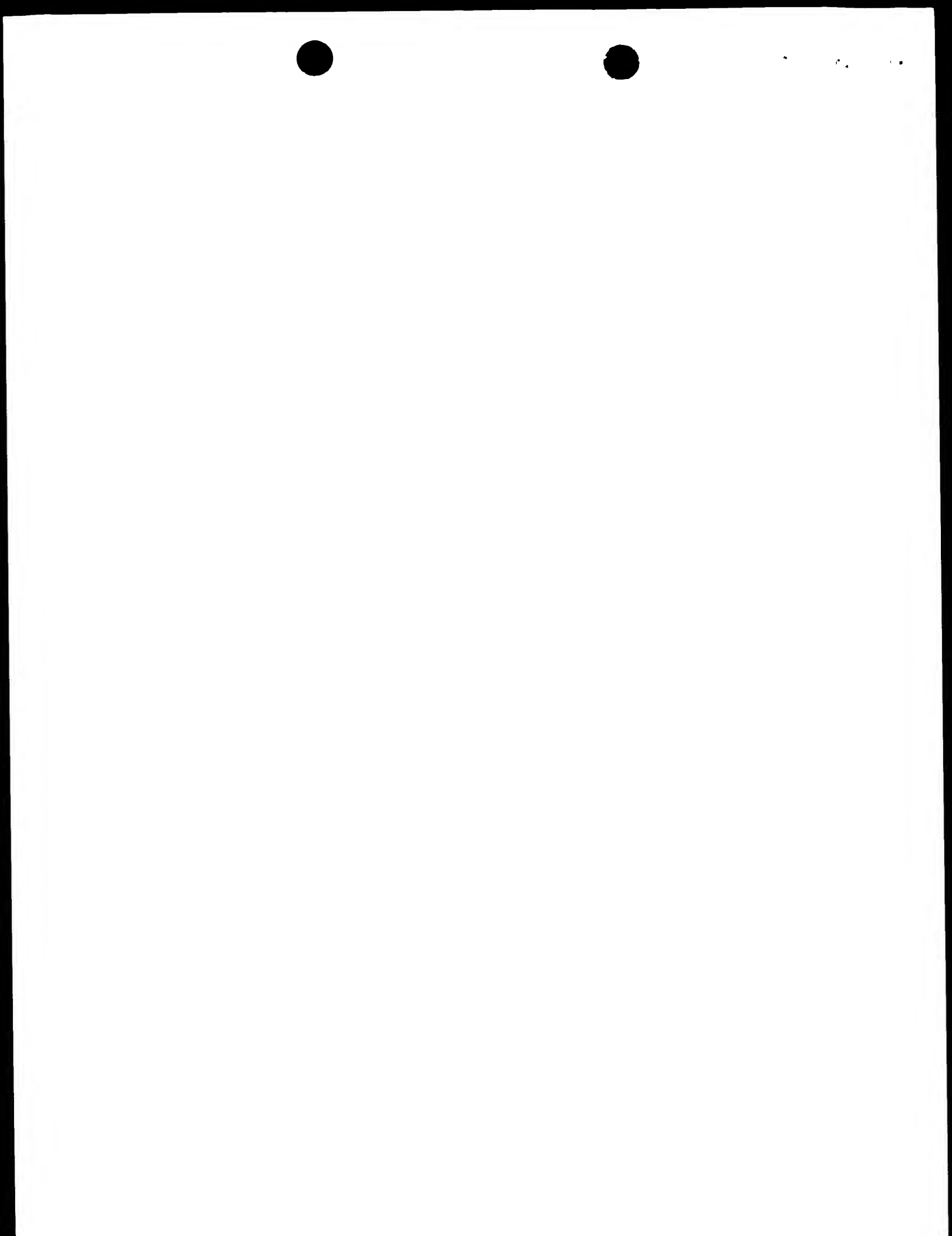
293T cells (which is derived from 293 cells (ATCC CRL-1573) and it stably transfected with SV40 T antigen) were transfected with pNotS and pNotS-mA55 using lipofection (GIBCOBRL). After preincubated for 19 hours, the cells were pulsed for 30 minutes with  $^{35}\text{S}$ -Met in the Met-free medium. Then the cells were incubated in the medium containing Met for 5 hours. Supernatant of the cells was recovered and concentrated 10-fold using centricon-10 (trade name, AMICON). Samples were subjected to SDS-polyacrylamide-gel electrophoresis. The gel was dried and  $^{35}\text{S}$ -labeled proteins were detected with BAS 2000 (Fuji Film).

A band was detected at 60-70 kDa in the supernatant of pNotS-mA55-transfected 293T cells. This band was not detected in the supernatant of pNotS-transfected 293T cells. This results confirmed that recombinant mouse A55 protein was expressed and secreted into the medium.

Molecular weight (60-70 kDa) of this recombinant mouse A55 protein was greater than it (48 kDa) predicted from its amino acid sequences. As this protein had two potential N-linked glycosylation sites and many Ser and Thr residues in which O-linked glycosyl chain could be added, it was suggested that the mouse A55 protein was a glycoprotein.

#### Example 8

Measurement of inhibition on proliferation of rat vascular smooth muscle cells by mouse A55 protein





Vascular smooth muscle cells were isolated from rat aorta ranging from heart to diaphragm and cultured primarily by the methods described in Shin Seikagaku Jikken Kouza 10 (The Japanese Biochemical Society).

These cells were co-incubated with 1, 3 or 10 ng/ml of human recombinant PDGF-BB (Genzyme) and 10% (v/v) of the mock or mA55 supernatant prepared according to the method described in example 7. And BrdU incorporation was measured using a Cell Proliferation ELISA, BrdU colorimetric kit (Boehringer-Mannheim).

The supernatant from 293T cells transfected with pNotS-mA55 significantly inhibited BrdU incorporation of rat primary vascular smooth muscle cells, while the supernatant from 293T cells transfected with only pNotS show no effect as shown in Fig. 1.

Moreover the supernatant from 293T cells transfected with pNotS-mA55 also inhibited BrdU incorporation even when rat vascular smooth muscle cells were stimulated with 1, 3 or 10 ng/ml of PDGF and increased BrdU incorporation in a dose-dependent manner, whereas the supernatant from 293T cells transfected with only pNotS did not affect compared with no supernatant addition (See Fig. 1).

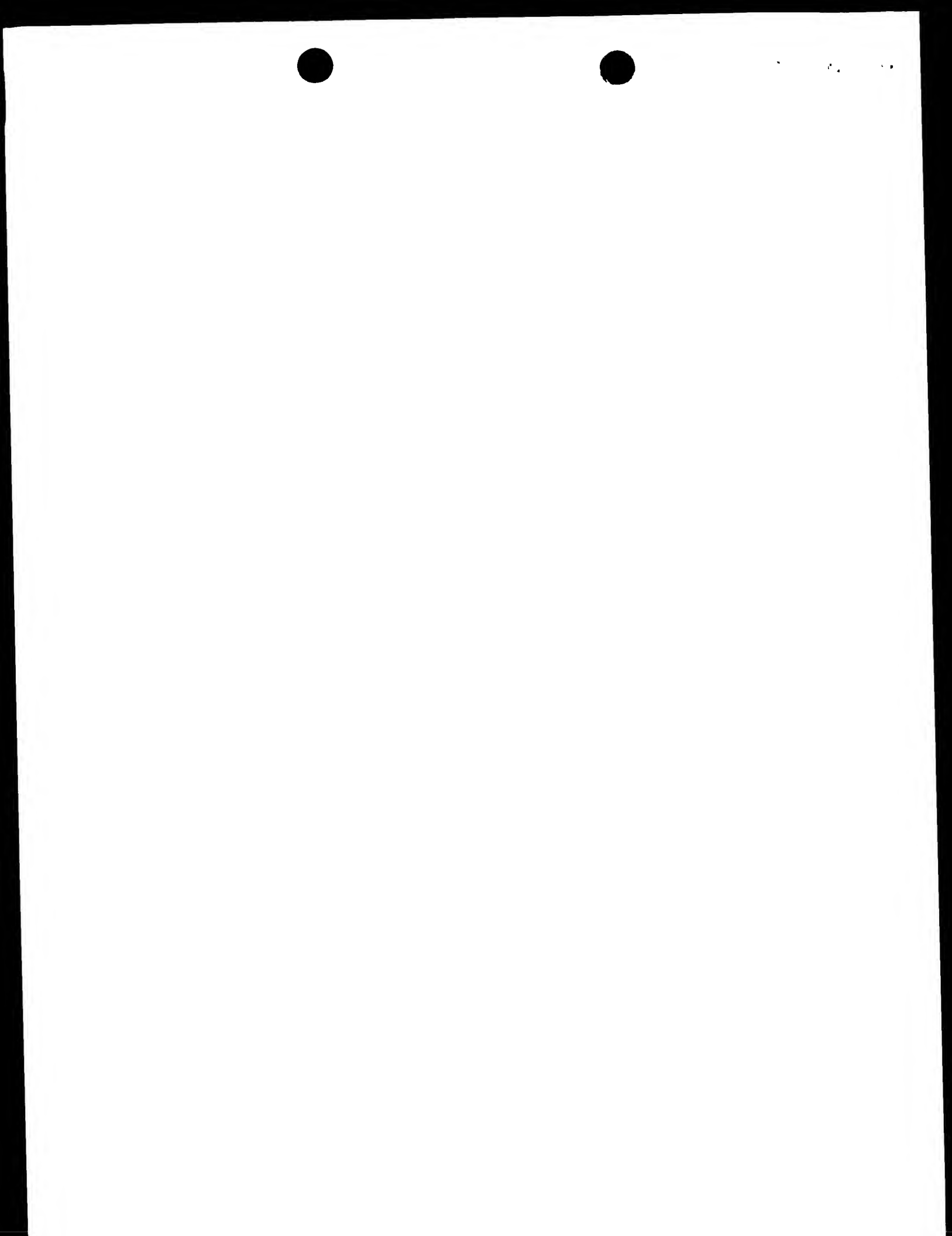
These data revealed that the recombinant mouse A55 protein had the growth inhibitory activity on vascular smooth muscle cells.

#### Example 9

##### Human A55 protein expression in mammalian cell

Human A55 expression plasmid, pNotS-hA55, was constructed by inserting human full-length cDNA shown in SEQ ID NO. 13 into was into expression vector for mammalian cell pNotS (Kaufman et al., Nucleic Acids Res. 19, 4485-4490 (1991)).

Cos1 cells were transfected with pNotS and pNotS-hA55 by lipofectin



(GIBCOBRL). After preincubation for 24 hours, the cells were pulsed for 5 hours with 35S-Met and 35S-Cys. Supernatant of the cells was recovered and concentrated to 10-fold using centricon-10 (trade name, AMICON). Proteins in concentrated supernatant were separated by electrophoresis through SDS-page. The gel was dried and 35S-labeled proteins were detected with BAS 2000 (Fuji Film).

A band was detected at 60-70 kDa in the supernatant from Cos1 cells transfected with pNotS-hA55. This band was not detected in the supernatant of pNotS transfected Cos1 cells. These results confirmed that recombinant human A55 protein was expressed and secreted into the medium. And human A55 protein was also suggested that sugar chains were also added to human A55 protein as well as mouse A55.

#### Example 10

Detection of the inhibitory activity on proliferation of rat vascular smooth muscle cells by human A55 protein

A DNA fragment encoding a signal sequence of honey bee merritin, a tag sequence of six His residues and an enterokinase cleavage site was added to 5'-end of human A55 cDNA sequence from 238 to 1515 in SEQ ID NO. 13 or sequence in SEQ ID NO. 15 followed by stop codon and inserted into expression vector pNotS. Cos1 cells were transfected with pNotS-hA55 plasmid DNA and pNotS control plasmid DNA. The supernatant was recovered, digested by enterokinase, pulled through nickel column to remove the linker peptide, and then concentrated 10-fold by centricon-10 (trade name, AMICON).

After rat vascular muscle cell line (ATCC CRL-1444) was cultured in 96 well plates with 10% FBS for 24 hours, these cells were incubated for 24 hours with serum-free medium supplemented with several concentrations (1, 10 or 10 ng/ml) of human PDGF-BB (Genzyme) and with 10 % total volume



of supernatant of Cos1 cells which were transfected with pNotS-hA55 or pNotS, and then were pulsed for 4 hours with 3H-thymidine. After harvesting 3H-thymidine incorporation was detected. In this cell line remarkable decrease of 3H-thymidine incorporation were observed by supplement with hA55 supernatant, while there was no effect in the presence of the control supernatant.

Moreover similar effects were also observed when using other rat vascular smooth muscle cell lines (ATCC CRL-1476 and CRL-2018) and human vascular smooth muscle cell line (ATCC CRL-1999). These results revealed that the recombinant human A55 protein also had the growth inhibitory activity on the vascular smooth muscle cells as well as mouse A55 protein.

Morphological change was observed on the vascular smooth muscle cells treated with the supernatant from hA55-transfected Cos1 cells by microscopy detection. While no morphological change was observed on melanoma cell line SK-MEL-28 at the same experiment. Furthermore, hA55 protein was observed to induce the expression of chemokine JE and JK.

#### Experiment 11

##### Preparation of anti mouse A55 polyclonal antibody

Three kinds of peptide fragments of mouse A55 were synthesized by solid phase method:

RTNPVYRGPYSNPYSTSYSG (71-90) (48-67 of SEQ ID NO. 1)  
GAYYIFQIKSGNEGREFYMR (376-395) (353-372 of SEQ ID NO. 1)  
MTRPIKGPRDIQLDLEMITVN (406-426) (383-403 of SEQ ID NO. 1).

Rabbits were immunized to these peptides as immunogen and the serum were prepared after measurement of the activity. Each anti-mouse A55



1 2 3

antibody was purified by affinity column immobilized each peptide which was used as immunogen from the obtained serum.

The supernatant prepared by the same method described in example 7, was subjected to SDS-PAGE, the separated proteins were transferred to Immobilon-P (PVDF membrane, trade name, Millopore) from the acrylamide gel.

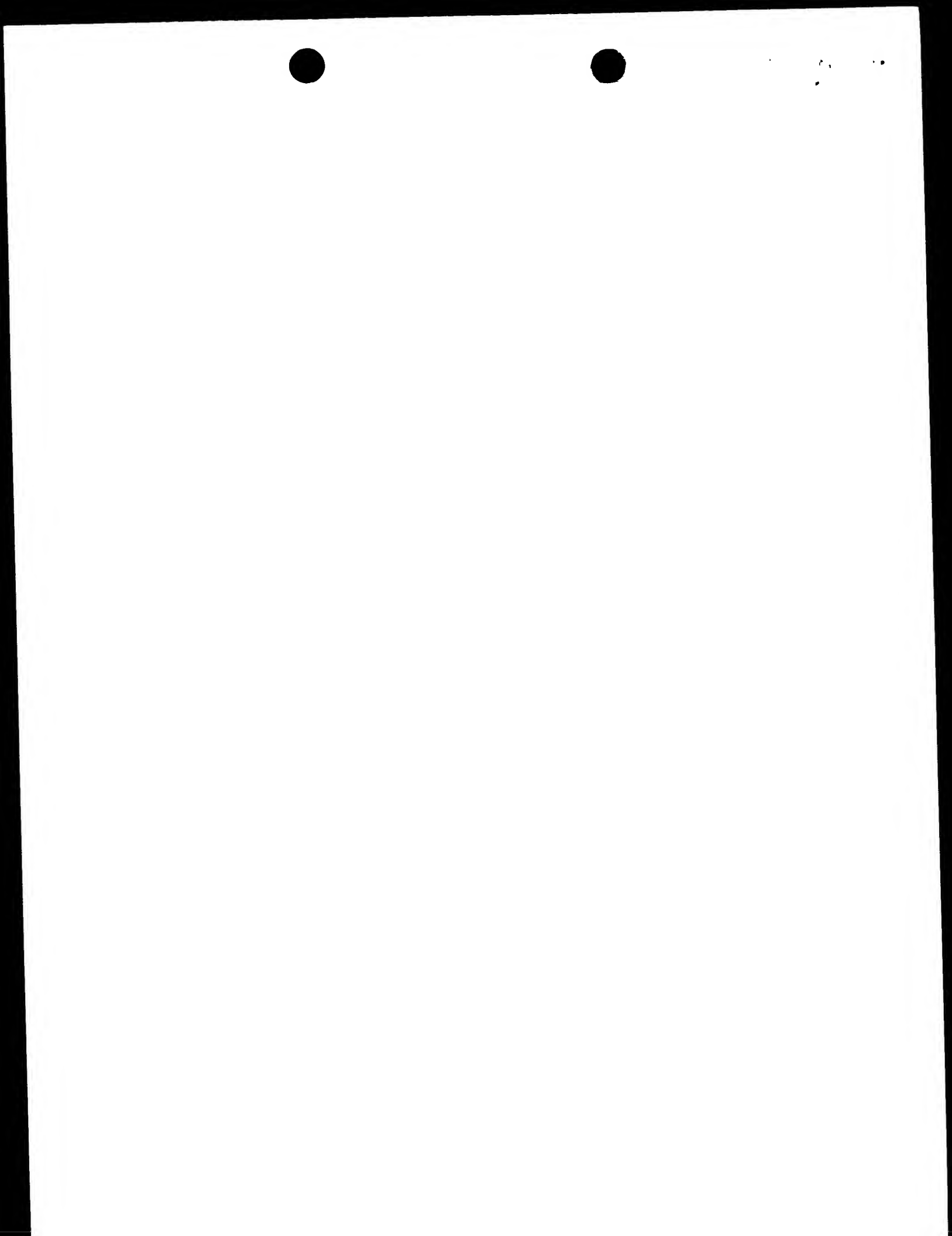
After blocking the membranes they were incubated with the anti mouse A55 polyclonal antibody as the first antibody and by developing using ECL kit (Amersham), the recombinant mouse A55 protein was detected.

A 60 k Da band was detected in the supernatant from mA55 transfected Cos1 cells as well as 35S-labeling experiment described in example 7. While no bands were detected in the supernatant from mock-transfected Cos1 cells. These results confirmed that the obtained polyclonal antibodies specifically recognized the mouse A55 protein.

#### **Brief Description of Figures**

Fig. 1 It shows that mouse A55 protein inhibits proliferation of rat aortic vascular smooth muscle cells which was stimulated by PDGF.

Fig. 2 It shows that human A55 protein inhibits proliferation of rat aortic vascular smooth muscle cells which was stimulated by PDGF.





# Sequence Listing

SEQ ID NO. : 1

Length : 448 amino acids

Type : amino acid

Topology : liner

Molecule type : protein

Sequence Description :

Met Pro Gly Leu Lys Arg Ile Leu Thr Val Thr Ile Leu Ala Leu Trp  
-23            -20                    -15                    -10

Leu Pro His Pro Gly Asn Ala Gln Gln Gln Cys Thr Asn Gly Phe Asp  
             -5                                1                                5

Leu Asp Arg Gln Ser Gly Gln Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Thr  
10                                15                                20                                25

Ile Pro Glu Ala Cys Arg Gly Asp Met Met Cys Val Asn Gln Asn Gly  
                              30                                35                                40

Gly Tyr Leu Cys Ile Pro Arg Thr Asn Pro Val Tyr Arg Gly Pro Tyr  
                              45                                50                                55

Ser Asn Pro Tyr Ser Thr Ser Tyr Ser Gly Pro Tyr Pro Ala Ala Ala  
                              60                                65                                70

Pro Pro Val Pro Ala Ser Asn Tyr Pro Thr Ile Ser Arg Pro Leu Val  
                              75                                80                                85



Cys Arg Phe Gly Tyr Gln Met Asp Glu Gly Asn Gln Cys Val Asp Val

90

95

100

105

Asp Glu Cys Ala Thr Asp Ser His Gln Cys Asn Pro Thr Gln Ile Cys

110

115

120

Ile Asn Thr Glu Gly Gly Tyr Thr Cys Ser Cys Thr Asp Gly Tyr Trp

125

130

135

Leu Leu Glu Gly Gln Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Tyr Gly Tyr

140

145

150

Cys Gln Gln Leu Cys Ala Asn Val Pro Gly Ser Tyr Ser Cys Thr Cys

155

160

165

Asn Pro Gly Phe Thr Leu Asn Asp Asp Gly Arg Ser Cys Gln Asp Val

170

175

180

185

Asn Glu Cys Glu Thr Glu Asn Pro Cys Val Gln Thr Cys Val Asn Thr

190

195

200

Tyr Gly Ser Phe Ile Cys Arg Cys Asp Pro Gly Tyr Glu Leu Glu Glu

205

210

215

Asp Gly Ile His Cys Ser Asp Met Asp Glu Cys Ser Phe Ser Glu Phe

220

225

230



Leu Cys Gln His Glu Cys Val Asn Gln Pro Gly Ser Tyr Phe Cys Ser  
235 240 245

Cys Pro Pro Gly Tyr Val Leu Leu Asp Asp Asn Arg Ser Cys Gln Asp  
250 255 260 265

Ile Asn Glu Cys Glu His Arg Asn His Thr Cys Thr Ser Leu Gln Thr  
270 275 280

Cys Tyr Asn Leu Gln Gly Gly Phe Lys Cys Ile Asp Pro Ile Ser Cys  
285 290 295

Glu Glu Pro Tyr Leu Leu Ile Gly Glu Asn Arg Cys Met Cys Pro Ala  
300 305 310

Glu His Thr Ser Cys Arg Asp Gln Pro Phe Thr Ile Leu Tyr Arg Asp  
315 320 325

Met Asp Val Val Ser Gly Arg Ser Val Pro Ala Asp Ile Phe Gln Met  
330 335 340 345

Gln Ala Thr Thr Arg Tyr Pro Gly Ala Tyr Tyr Ile Phe Gln Ile Lys  
350 355 360

Ser Gly Asn Glu Gly Arg Glu Phe Tyr Met Arg Gln Thr Gly Pro Ile  
365 370 375

Ser Ala Thr Leu Val Met Thr Arg Pro Ile Lys Gly Pro Arg Asp Ile



380

385

390

Gln Leu Asp Leu Glu Met Ile Thr Val Asn Thr Val Ile Asn Phe Arg

395

400

405

Gly Ser Ser Val Ile Arg Leu Arg Ile Tyr Val Ser Gln Tyr Pro Phe

410

415

420

425

SEQ ID NO. : 2

Length : 1344 base pairs

Type : nucleic acid

Strandness : single

Topology : liner

Molecule type : cDNA to mRNA

Sequence Description

ATGCCAGGAT TAAAAAGGAT ACTCACTGTT ACCATCTTGG CACTCTGGCT TCCACATCCT 60

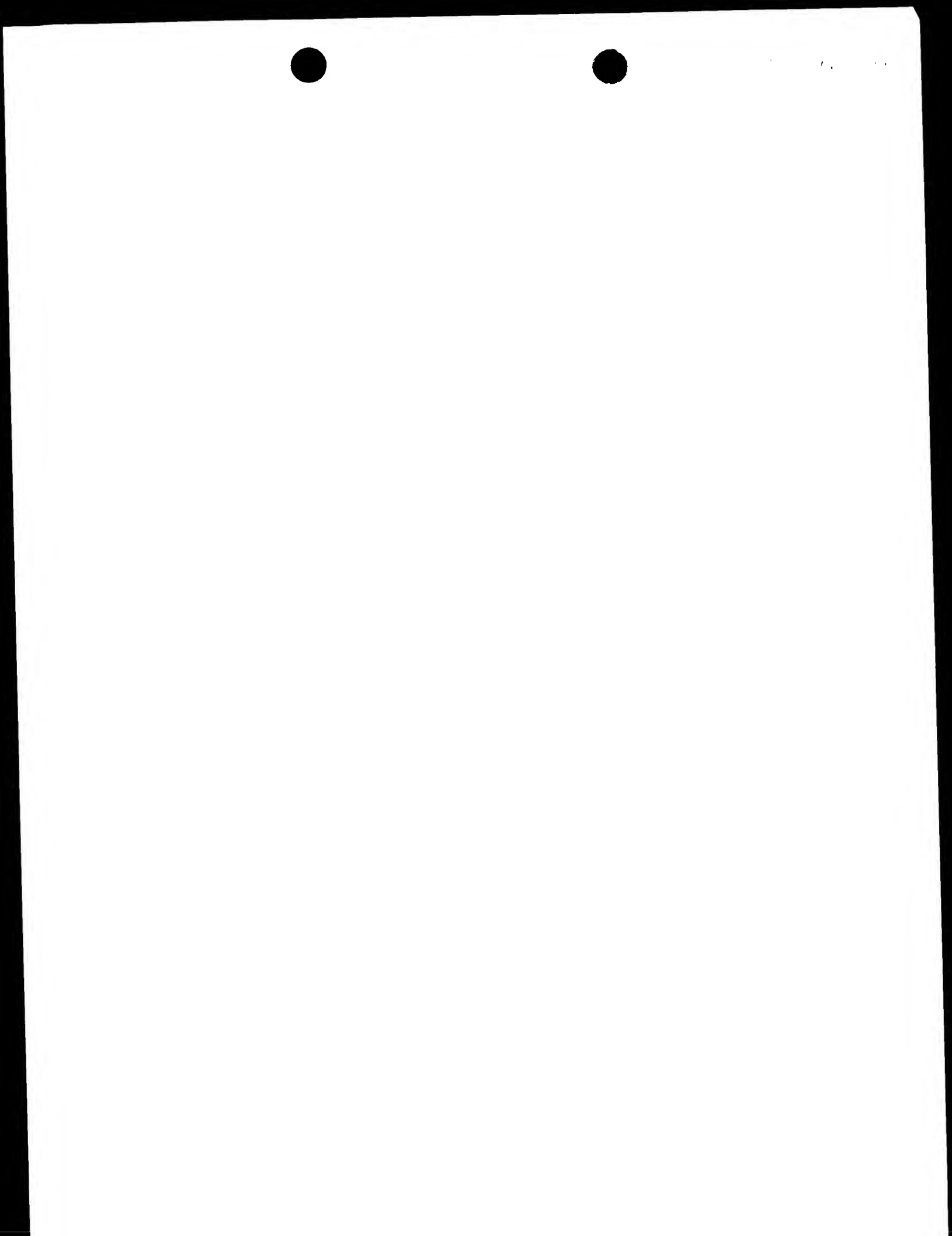
GGGAATGCAC AGCAGCAGTG CACAAACGGC TTTGACCTGG ACCGCCAGTC AGGACAGTGT 120

CTAGATATTG ATGAATGCCG GACCATCCCT GAGGCTTGTC GTGGGGACAT GATGTGTGTC 180

AACCAGAATG GCGGGTATTT GTGCATCCCT CGAACCAACC CAGTGTATCG AGGGCCTTAC 240

TCAAATCCCT ACTCTACATC CTACTCAGGC CCATACCCAG CAGCGGCCCC ACCAGTACCA 300

GCTTCCAAC TACCCACGAT TTCAAGGCCT CTTGTCTGCC GCTTTGGGTA TCAGATGGAT 360





GAAGGCAACC AGTGTGTGGA TGTGGACGAG TGTGCAACAG ACTCACACCA GTGCAACCCT 420  
 ACCCAGATCT GTATCAACAC TGAAGGAGGT TACACCTGCT CCTGCACCGA TGGGTACTGG 480  
 CTTCTGGAAG GGCAGTGCCT AGATATTGAT GAATGTCGCT ATGGTTACTG CCAGCAGCTC 540  
 TGTGCAAATG TTCCAGGATC CTATTCCTGT ACATGCAACC CTGGTTTCAC CCTCAACGAC 600  
 GATGGAAGGT CTTGCCAAGA TGTGAACGAG TGCGAACTG AGAATCCCTG TGTTCAAGACC 660  
 TGTGTCAACA CCTATGGCTC TTTCATCTGC CGCTGTGACC CAGGATATGA ACTTGAGGAA 720  
 GATGGCATT C ACTGCAGTGA TATGGACGAG TGCAGCTTCT CCGAGTTCCT CTGTCAACAC 780  
 GAGTGTGTGA ACCAGCCGGG CTCATACTTC TGCTCGTGCC CTCCAGGCTA CGTCCTGTTG 840  
 GATGATAACC GAAGCTGCCA GGATATCAAT GAATGTGAGC ACCGAAACCA CACGTGTACC 900  
 TCACTGCAGA CTTGCTACAA TCTACAAGGG GGCTTCAAAT GTATTGATCC CATCAGCTGT 960  
 GAGGAGCCTT ATCTGCTGAT TGGTGAAAAC CGCTGTATGT GTCCTGCTGA GCACACCAGC 1020  
 TGCAGAGACC AGCCATTAC CATCCTGTAT CGGGACATGG ATGTGGTGTC AGGACGCTCC 1080  
 GTTCCTGCTG ACATCTTCCA GATGCAAGCA ACAACCCGAT ACCCTGGTGC CTATTACATT 1140  
 TTCCAGATCA AATCTGGCAA CGAGGGTCGA GAGTTCTATA TCGGGCAAAC AGGGCCTATC 1200



AGTGCCACCC TGGTGATGAC ACGCCCCATC AAAGGGCCTC GGGACATCCA GCTGGACTTG 1260

GAGATGATCA CTGTCAACAC TGTCATCAAC TTCAGAGGCA GCTCCGTGAT CCGACTGCGG 1320

ATATATGTGT CGCAGTATCC GTTC 1344

SEQ ID NO. : 3

Length : 2233 base pairs

Type : nucleic acid

Strandness : single

Topology : liner

Molecule type : cDNA to mRNA

Original source

Organism : Mus Musculus

Organelle : day13 mouse embryonic heart

Clone Name : mouse A55

Feature

Name/Key : CDS

Location : 75..1418

Identification method : S

Name/Key : sig peptide

Location : 75..143

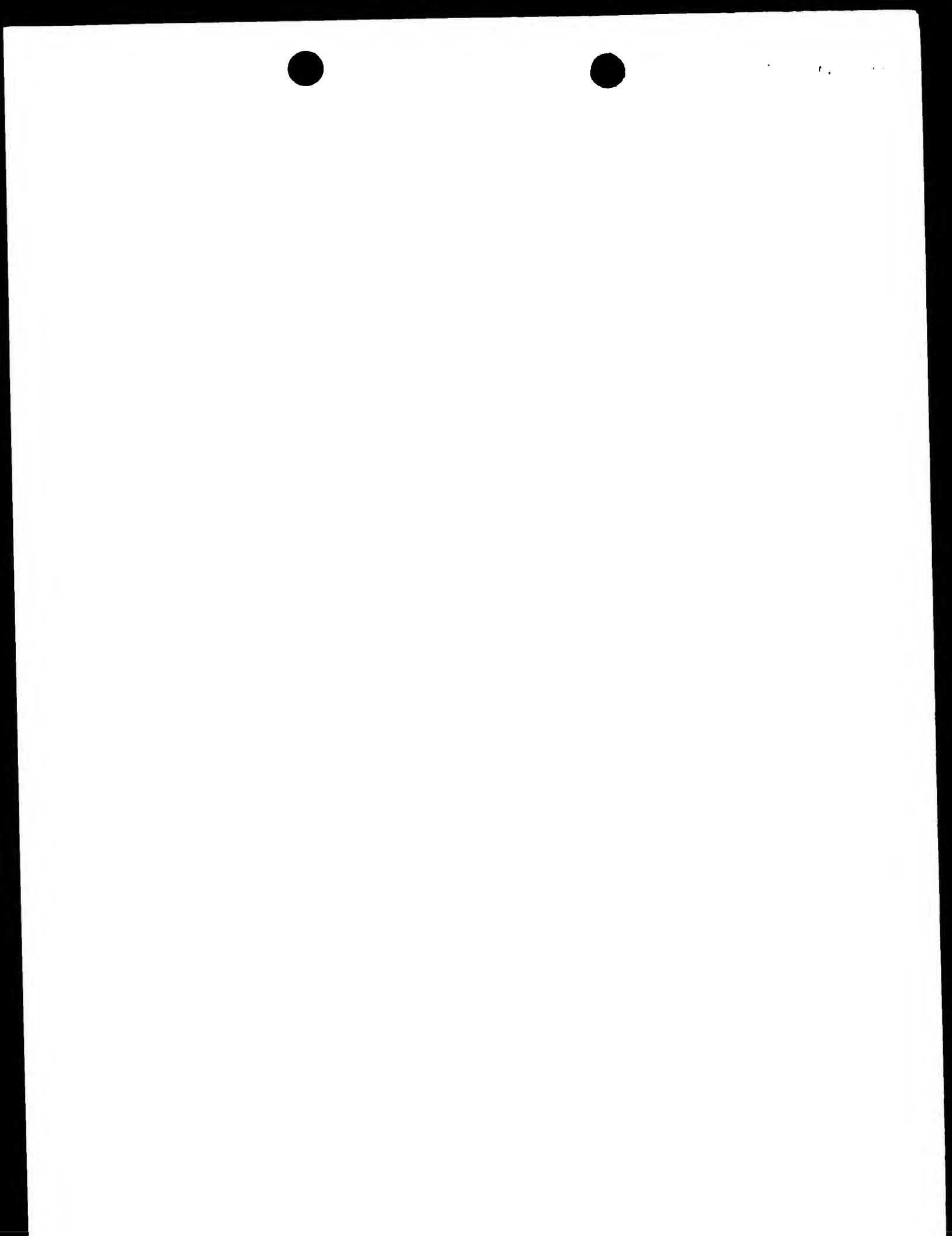
Identification method : S

Name/Key : mat peptide

Location : 144..1418

Identification method : S

Sequence Description:



AATTCGGCAC GAGCCCCAGT CCCACCGCAG AGCCTGCCTT CCTCGCGTCG CTTCTCCTCC 60

CGCGCATCTT GGAT ATG CCA GGA TTA AAA AGG ATA CTC ACT GTT ACC ATC 110

Met Pro Gly Leu Lys Arg Ile Leu Thr Val Thr Ile

-23 -20 -15

TTG GCA CTC TGG CTT CCA CAT CCT GGG AAT GCA CAG CAG CAG TGC ACA 158

Leu Ala Leu Trp Leu Pro His Pro Gly Asn Ala Gln Gln Gln Cys Thr

-10 -5 1 5

AAC GGC TTT GAC CTG GAC CGC CAG TCA GGA CAG TGT CTA GAT ATT GAT 206

Asn Gly Phe Asp Leu Asp Arg Gln Ser Gly Gln Cys Leu Asp Ile Asp

10 15 20

GAA TGC CGG ACC ATC CCT GAG GCT TGT CGT GGG GAC ATG ATG TGT GTC 254

Glu Cys Arg Thr Ile Pro Glu Ala Cys Arg Gly Asp Met Met Cys Val

25 30 35

AAC CAG AAT GGC GGG TAT TTG TGC ATC CCT CGA ACC AAC CCA GTG TAT 302

Asn Gln Asn Gly Gly Tyr Leu Cys Ile Pro Arg Thr Asn Pro Val Tyr

40 45 50

CGA GGG CCT TAC TCA AAT CCC TAC TCT ACA TCC TAC TCA GGC CCA TAC 350

Arg Gly Pro Tyr Ser Asn Pro Tyr Ser Thr Ser Tyr Ser Gly Pro Tyr

55 60 65

CCA GCA GCG GCC CCA CCA GTA CCA GCT TCC AAC TAC CCC ACG ATT TCA 398

Pro Ala Ala Ala Pro Pro Val Pro Ala Ser Asn Tyr Pro Thr Ile Ser



70	75	80	85	
AGG CCT CTT GTC TGC CGC TTT GGG TAT CAG ATG GAT GAA GGC AAC CAG				446
Arg Pro Leu Val Cys Arg Phe Gly Tyr Gln Met Asp Glu Gly Asn Gln				
	90	95	100	
TGT GTG GAT GTG GAC GAG TGT GCA ACA GAC TCA CAC CAG TGC AAC CCT				494
Cys Val Asp Val Asp Glu Cys Ala Thr Asp Ser His Gln Cys Asn Pro				
	105	110	115	
ACC CAG ATC TGT ATC AAC ACT GAA GGA GGT TAC ACC TGC TCC TGC ACC				542
Thr Gln Ile Cys Ile Asn Thr Glu Gly Gly Tyr Thr Cys Ser Cys Thr				
	120	125	130	
GAT GGG TAC TGG CTT CTG GAA GGG CAG TGC CTA GAT ATT GAT GAA TGT				590
Asp Gly Tyr Trp Leu Leu Glu Gly Gln Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys				
	135	140	145	
CGC TAT GGT TAC TGC CAG CAG CTC TGT GCA AAT GTT CCA GGA TCC TAT				638
Arg Tyr Gly Tyr Cys Gln Gln Leu Cys Ala Asn Val Pro Gly Ser Tyr				
	150	155	160	165
TCC TGT ACA TGC AAC CCT GGT TTC ACC CTC AAC GAC GAT GGA AGG TCT				686
Ser Cys Thr Cys Asn Pro Gly Phe Thr Leu Asn Asp Asp Gly Arg Ser				
	170	175	180	
TGC CAA GAT GTG AAC GAG TGC GAA ACT GAG AAT CCC TGT GTT CAG ACC				734
Cys Gln Asp Val Asn Glu Cys Glu Thr Glu Asn Pro Cys Val Gln Thr				





185

190

195

TGT GTC AAC ACC TAT GGC TCT TTC ATC TGC CGC TGT GAC CCA GGA TAT 782

Cys Val Asn Thr Tyr Gly Ser Phe Ile Cys Arg Cys Asp Pro Gly Tyr

200

205

210

GAA CTT GAG GAA GAT GGC ATT CAC TGC AGT GAT ATG GAC GAG TGC AGC 830

Glu Leu Glu Glu Asp Gly Ile His Cys Ser Asp Met Asp Glu Cys Ser

215

220

225

TTC TCC GAG TTC CTC TGT CAA CAC GAG TGT GTG AAC CAG CCG GGC TCA 878

Phe Ser Glu Phe Leu Cys Gln His Glu Cys Val Asn Gln Pro Gly Ser

230

235

240

245

TAC TTC TGC TCG TGC CCT CCA GGC TAC GTC CTG TTG GAT GAT AAC CGA 926

Tyr Phe Cys Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Val Leu Leu Asp Asp Asn Arg

250

255

260

AGC TGC CAG GAT ATC AAT GAA TGT GAG CAC CGA AAC CAC ACG TGT ACC 974

Ser Cys Gln Asp Ile Asn Glu Cys Glu His Arg Asn His Thr Cys Thr

265

270

275

TCA CTG CAG ACT TGC TAC AAT CTA CAA GGG GGC TTC AAA TGT ATT GAT 1022

Ser Leu Gln Thr Cys Tyr Asn Leu Gln Gly Gly Phe Lys Cys Ile Asp

280

285

290

CCC ATC AGC TGT GAG GAG CCT TAT CTG CTG ATT GGT GAA AAC CGC TGT 1070

Pro Ile Ser Cys Glu Glu Pro Tyr Leu Leu Ile Gly Glu Asn Arg Cys



295

300

305

ATG TGT CCT GCT GAG CAC ACC AGC TGC AGA GAC CAG CCA TTC ACC ATC 1118

Met Cys Pro Ala Glu His Thr Ser Cys Arg Asp Gln Pro Phe Thr Ile

310

315

320

325

CTG TAT CGG GAC ATG GAT GTG GTG TCA GGA CGC TCC GTT CCT GCT GAC 1166

Leu Tyr Arg Asp Met Asp Val Val Ser Gly Arg Ser Val Pro Ala Asp

330

335

340

ATC TTC CAG ATG CAA GCA ACA ACC CGA TAC CCT GGT GCC TAT TAC ATT 1214

Ile Phe Gln Met Gln Ala Thr Thr Arg Tyr Pro Gly Ala Tyr Tyr Ile

345

350

355

TTC CAG ATC AAA TCT GGC AAC GAG GGT CGA GAG TTC TAT ATG CGG CAA 1262

Phe Gln Ile Lys Ser Gly Asn Glu Gly Arg Glu Phe Tyr Met Arg Gln

360

365

370

ACA GGG CCT ATC AGT GCC ACC CTG GTG ATG ACA CGC CCC ATC AAA GGG 1310

Thr Gly Pro Ile Ser Ala Thr Leu Val Met Thr Arg Pro Ile Lys Gly

375

380

385

CCT CGG GAC ATC CAG CTG GAC TTG GAG ATG ATC ACT GTC AAC ACT GTC 1358

Pro Arg Asp Ile Gln Leu Asp Leu Glu Met Ile Thr Val Asn Thr Val

390

395

400

405

ATC AAC TTC AGA GGC AGC TCC GTG ATC CGA CTG CGG ATA TAT GTG TCG 1406

Ile Asn Phe Arg Gly Ser Ser Val Ile Arg Leu Arg Ile Tyr Val Ser



410

415

420

CAG TAT CCG TTC TGAGCCTCTG GCTAAGGCCT CTGACACTGC CTTTCACCAG 1458

Gln Tyr Pro Phe

425

CACCGAGGGA CGGGAGGAGA AAGGAAACCA GCAAGAATGA GAGCGAGACA GACATTGCAC 1518

CTTTCCTGCT GAATATCTCC TGGGGGCATC AGCCTAGCAT CTTGACCCAT ATCTGTACTA 1578

TTGCAGATGG TCACTCTGAA GGACACCCTG CCCTCAGTTC CTATGATGCA GTTATCCAAA 1638

AGTGTTTCATC TTAGCCCCTG ATATGAGGTT GCCAGTGACT CTTCAAAGCC TTCCATTTAT 1698

TTCCATCGTT TTATAAAAAA GAAAATAGAT TAGATTTGCT GGGGTATGAG TCCTCGAAGG 1758

TTCAAAGAC TGAGTGGCTT GCTCTCACCT CTTCCTCTCC TTCCTCCATC TCTTGCTGCA 1818

TTGCTGCTTT GCAAAAGTCC TCATGGGCTC GTGGGAAATG CTGGGAATAG CTAGTTTGCT 1878

TCTTGCATGT TCTGAGAAGG CTATGGGAAC ACACCACAGC AGGATCGAAG GTTTTTATAG 1938

AGTCTATTTT AAAATCACAT CTGGTATTTT CAGCATAAAA GAAATTTTAG TTGTCTTTAA 1998

AATTTGTATG AGTGTTTAAAC CTTTCTTAT TCATTTTGAG GCTTCTTAAA GTGGTAGAAT 2058

TCCTTCCAAA GGCCTCAGAT ACATGTTATG TTCAGTCTTT CCAACCTCAT CCTTTCCTGC 2118



ATCTTAGCCC AGTTTTTACG AAGACCCCTT AATCATGCTT TNTTAAGAGT TTTTACCCAA 2178

CTGCGTTGGA AGACAGAGGT ATCCAGACTG ATTAAATAAT TGAAGAAAAA AAAAA 2233

SEQ ID NO. : 4

Length : 423 amino acids

Type : amino acid

Topology : liner

Molecule type : protein

Sequence Description :

Gln Cys Thr Asn Gly Phe Asp Leu Asp Arg Gln Ser Gly Gln Cys Leu  
1 5 10 15

Asp Ile Asp Glu Cys Arg Thr Ile Pro Glu Ala Cys Arg Gly Asp Met  
20 25 30

Met Cys Val Asn Gln Asn Gly Gly Tyr Leu Cys Ile Pro Arg Thr Asn  
35 40 45

Pro Val Tyr Arg Gly Pro Tyr Ser Asn Pro Tyr Ser Thr Ser Tyr Ser  
50 55 60

Gly Pro Tyr Pro Ala Ala Ala Pro Pro Val Pro Ala Ser Asn Tyr Pro  
65 70 75 80

Thr Ile Ser Arg Pro Leu Val Cys Arg Phe Gly Tyr Gln Met Asp Glu  
85 90 95





Gly Asn Gln Cys Val Asp Val Asp Glu Cys Ala Thr Asp Ser His Gln

100

105

110

Cys Asn Pro Thr Gln Ile Cys Ile Asn Thr Glu Gly Gly Tyr Thr Cys

115

120

125

Ser Cys Thr Asp Gly Tyr Trp Leu Leu Glu Gly Gln Cys Leu Asp Ile

130

135

140

Asp Glu Cys Arg Tyr Gly Tyr Cys Gln Gln Leu Cys Ala Asn Val Pro

145

150

155

160

Gly Ser Tyr Ser Cys Thr Cys Asn Pro Gly Phe Thr Leu Asn Asp Asp

165

170

175

Gly Arg Ser Cys Gln Asp Val Asn Glu Cys Glu Thr Glu Asn Pro Cys

180

185

190

Val Gln Thr Cys Val Asn Thr Tyr Gly Ser Phe Ile Cys Arg Cys Asp

195

200

205

Pro Gly Tyr Glu Leu Glu Glu Asp Gly Ile His Cys Ser Asp Met Asp

210

215

220

Glu Cys Ser Phe Ser Glu Phe Leu Cys Gln His Glu Cys Val Asn Gln

225

230

235

240



Pro Gly Ser Tyr Phe Cys Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Val Leu Leu Asp  
245 250 255

Asp Asn Arg Ser Cys Gln Asp Ile Asn Glu Cys Glu His Arg Asn His  
260 265 270

Thr Cys Thr Ser Leu Gln Thr Cys Tyr Asn Leu Gln Gly Gly Phe Lys  
275 280 285

Cys Ile Asp Pro Ile Ser Cys Glu Glu Pro Tyr Leu Leu Ile Gly Glu  
290 295 300

Asn Arg Cys Met Cys Pro Ala Glu His Thr Ser Cys Arg Asp Gln Pro  
305 310 315 320

Phe Thr Ile Leu Tyr Arg Asp Met Asp Val Val Ser Gly Arg Ser Val  
325 330 335

Pro Ala Asp Ile Phe Gln Met Gln Ala Thr Thr Arg Tyr Pro Gly Ala  
340 345 350

Tyr Tyr Ile Phe Gln Ile Lys Ser Gly Asn Glu Gly Arg Glu Phe Tyr  
355 360 365

Met Arg Gln Thr Gly Pro Ile Ser Ala Thr Leu Val Met Thr Arg Pro  
370 375 380

Ile Lys Gly Pro Arg Asp Ile Gln Leu Asp Leu Glu Met Ile Thr Val



385

390

395

400

Asn Thr Val Ile Asn Phe Arg Gly Ser Ser Val Ile Arg Leu Arg Ile

405

410

415

Tyr Val Ser Gln Tyr Pro Phe

420

SEQ ID NO. : 5

Length : 1269 base pairs

Type : nucleic acid

Strandness : single

Topology : liner

Molecule type : cDNA to mRNA

Sequence Description:

CAGTGCACAA ACGGCTTTGA CCTGGACCGC CAGTCAGGAC AGTGTCTAGA TATTGATGAA 60

TGCCGGACCA TCCCTGAGGC TTGTCGTGGG GACATGATGT GTGTCAACCA GAATGGCGGG 120

TATTTGTGCA TCCCTCGAAC CAACCCAGTG TATCGAGGGC CTTACTCAAA TCCCTACTCT 180

ACATCCTACT CAGGCCCATATA CCCAGCAGCG GCCCCACCAG TACCAGCTTC CAACTACCCC 240

ACGATTTCAA GGCCTCTTGT CTGCCGCTTT GGGTATCAGA TGGATGAAGG CAACCAAGTGT 300

GTGGATGTGG ACGAGTGTGC AACAGACTCA CACCAGTGCA ACCCTACCCA GATCTGTATC 360



AACACTGAAG GAGGTTACAC CTGCTCCTGC ACCGATGGGT ACTGGCTTCT GGAAGGGCAG 420  
  
TGCCTAGATA TTGATGAATG TCGCTATGGT TACTGCCAGC AGCTCTGTGC AAATGTTCCA 480  
  
GGATCCTATT CCTGTACATG CAACCCTGGT TTCACCCTCA ACGACGATGG AAGGTCTTGC 540  
  
CAAGATGTGA ACGAGTGCGA AACTGAGAAT CCCTGTGTTC AGACCTGTGT CAACACCTAT 600  
  
GGCTCTTTCA TCTGCCGCTG TGACCCAGGA TATGAACTTG AGGAAGATGG CATTCCTGTC 660  
  
AGTGATATGG ACGAGTGCAG CTTCTCCGAG TTCCTCTGTC AACACGAGTG TGTGAACCAG 720  
  
CCGGGCTCAT ACTTCTGCTC GTGCCCTCCA GGCTACGTCC TGTGGATGA TAACCGAAGC 780  
  
TGCCAGGATA TCAATGAATG TGAGCACCGA AACCACACGT GTACCTCACT GCAGACTTGC 840  
  
TACAATCTAC AAGGGGGCTT CAAATGTATT GATCCCATCA GCTGTGAGGA GCCTTATCTG 900  
  
CTGATTGGTG AAAACCGCTG TATGTGTCCT GCTGAGCACA CCAGCTGCAG AGACCAGCCA 960  
  
TTCACCATCC TGTATCGGGA CATGGATGTG GTGTCAGGAC GCTCCGTTCC TGCTGACATC 1020  
  
TTCCAGATGC AAGCAACAAC CCGATACCCT GGTGCCTATT ACATTTTCCA GATCAAATCT 1080  
  
GGCAACGAGG GTCGAGAGTT CTATATGCGG CAAACAGGGC CTATCAGTGC CACCCTGGTG 1140  
  
ATGACACGCC CCATCAAAGG GCCTCGGGAC ATCCAGCTGG ACTTGAGAT GATCACTGTC 1200





AACACTGTCA TCAACTTCAG AGGCAGCTCC GTGATCCGAC TGCGGATATA TGTGTCGCAG 1260

TATCCGTTC

1269

SEQ ID NO. : 6

Length : 461 amino acids

Type : amino acid

Topology : liner

Molecule type : protein

Sequence Description:

Met Gly Pro Arg Ser Phe Glu Pro Met His Ser Gly Leu Cys Arg Gln

-36 -35

-30

-25

Arg Arg Met Ile Leu Thr Val Thr Ile Leu Ala Leu Trp Leu Pro His

-20

-15

-10

-5

Pro Gly Asn Ala Gln Gln Gln Cys Thr Asn Gly Phe Asp Leu Asp Arg

1

5

10

Gln Ser Gly Gln Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Thr Ile Pro Glu

15

20

25

Ala Cys Arg Gly Asp Met Met Cys Val Asn Gln Asn Gly Gly Tyr Leu

30

35

40

Cys Ile Pro Arg Thr Asn Pro Val Tyr Arg Gly Pro Tyr Ser Asn Pro



45

50

55

60

Tyr Ser Thr Ser Tyr Ser Gly Pro Tyr Pro Ala Ala Ala Pro Pro Val

65

70

75

Pro Ala Ser Asn Tyr Pro Thr Ile Ser Arg Pro Leu Val Cys Arg Phe

80

85

90

Gly Tyr Gln Met Asp Glu Gly Asn Gln Cys Val Asp Val Asp Glu Cys

95

100

105

Ala Thr Asp Ser His Gln Cys Asn Pro Thr Gln Ile Cys Ile Asn Thr

110

115

120

Glu Gly Gly Tyr Thr Cys Ser Cys Thr Asp Gly Tyr Trp Leu Leu Glu

125

130

135

140

Gly Gln Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Tyr Gly Tyr Cys Gln Gln

145

150

155

Leu Cys Ala Asn Val Pro Gly Ser Tyr Ser Cys Thr Cys Asn Pro Gly

160

165

170

Phe Thr Leu Asn Asp Asp Gly Arg Ser Cys Gln Asp Val Asn Glu Cys

175

180

185

Glu Thr Glu Asn Pro Cys Val Gln Thr Cys Val Asn Thr Tyr Gly Ser

190

195

200



Phe Ile Cys Arg Cys Asp Pro Gly Tyr Glu Leu Glu Glu Asp Gly Ile  
205 210 215 220

His Cys Ser Asp Met Asp Glu Cys Ser Phe Ser Glu Phe Leu Cys Gln  
225 230 235

His Glu Cys Val Asn Gln Pro Gly Ser Tyr Phe Cys Ser Cys Pro Pro  
240 245 250

Gly Tyr Val Leu Leu Asp Asp Asn Arg Ser Cys Gln Asp Ile Asn Glu  
255 260 265

Cys Glu His Arg Asn His Thr Cys Thr Ser Leu Gln Thr Cys Tyr Asn  
270 275 280

Leu Gln Gly Gly Phe Lys Cys Ile Asp Pro Ile Ser Cys Glu Glu Pro  
285 290 295 300

Tyr Leu Leu Ile Gly Glu Asn Arg Cys Met Cys Pro Ala Glu His Thr  
305 310 315

Ser Cys Arg Asp Gln Pro Phe Thr Ile Leu Tyr Arg Asp Met Asp Val  
320 325 330

Val Ser Gly Arg Ser Val Pro Ala Asp Ile Phe Gln Met Gln Ala Thr  
335 340 345



Thr Arg Tyr Pro Gly Ala Tyr Tyr Ile Phe Gln Ile Lys Ser Gly Asn

350

355

360

Glu Gly Arg Glu Phe Tyr Met Arg Gln Thr Gly Pro Ile Ser Ala Thr

365

370

375

380

Leu Val Met Thr Arg Pro Ile Lys Gly Pro Arg Asp Ile Gln Leu Asp

385

390

395

Leu Glu Met Ile Thr Val Asn Thr Val Ile Asn Phe Arg Gly Ser Ser

400

405

410

Val Ile Arg Leu Arg Ile Tyr Val Ser Gln Tyr Pro Phe

415

420

425

SEQ ID NO. : 7

Length : 1383 base pairs

Type : nucleic acid

Strandness : single

Topology : liner

Molecule type : cDNA to mRNA

Sequence Description:

ATGGGACCTA GAAGTTTCGA GCCAATGCAC AGTGGACTCT GCAGACAGAG ACGCATGATA 60

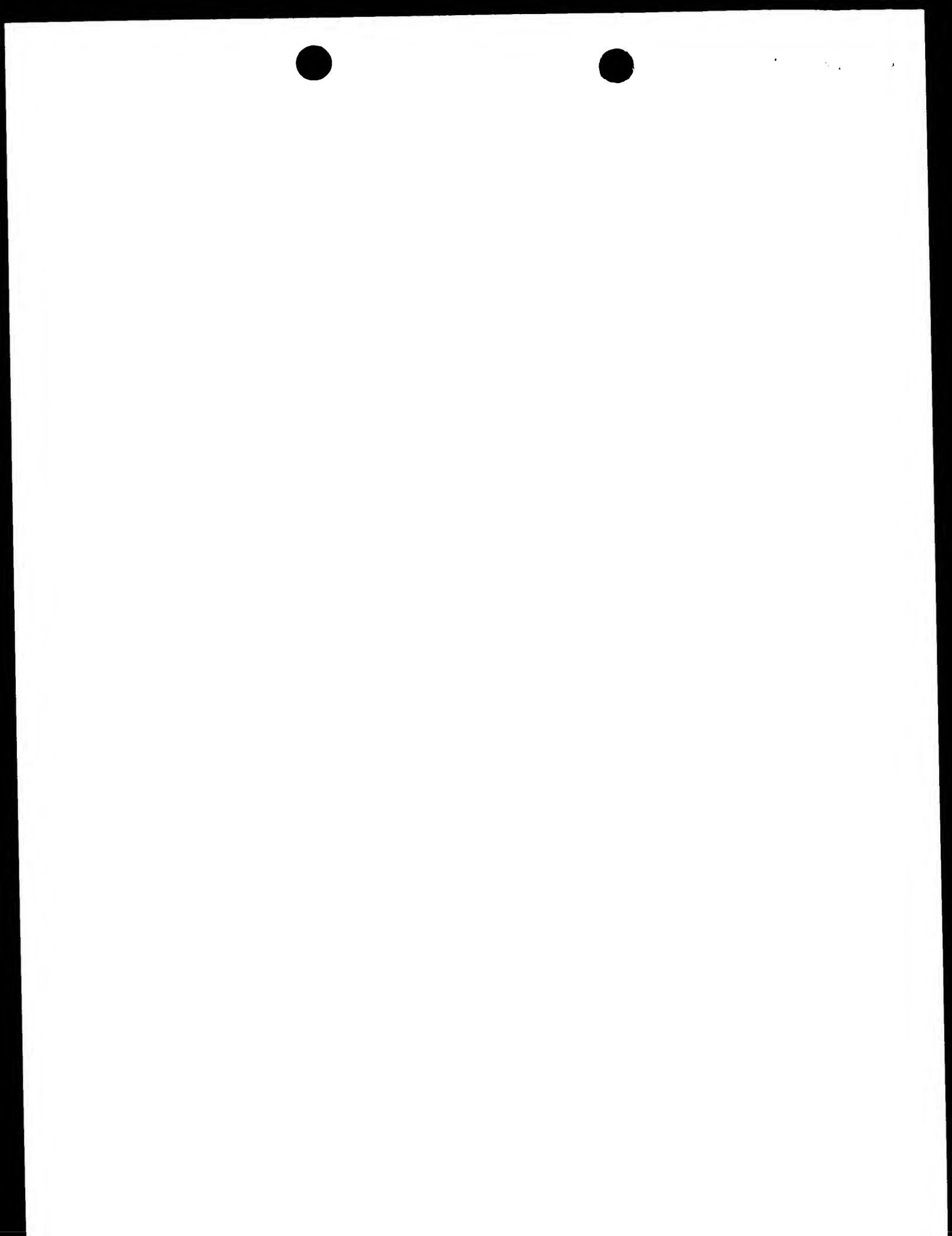
CTCACTGTTA CCATCTTGGC ACTCTGGCTT CCACATCCTG GGAATGCACA GCAGCAGTGC 120

ACAAACGGCT TTGACCTGGA CCGCCAGTCA GGACAGTGTC TAGATATTGA TGAATGCCGG 180





ACCATCCCTG AGGCTTGTCTG TGGGGACATG ATGTGTGTCA ACCAGAATGG CGGGTATTTG 240  
 TGCATCCCTC GAACCAACCC AGTGTATCGA GGGCCTTACT CAAATCCCTA CTCTACATCC 300  
 TACTCAGGCC CATACCCAGC AGCGGCCCCA CCAGTACCAG CTTCCAATA CCCCACGATT 360  
 TCAAGGCCTC TTGTCTGCCG CTTTGGGTAT CAGATGGATG AAGGCAACCA GTGTGTGGAT 420  
 GTGGACGAGT GTGCAACAGA CTCACACCAG TGCAACCCTA CCCAGATCTG TATCAAACT 480  
 GAAGGAGGTT ACACCTGCTC CTGCACCGAT GGGTACTGGC TTCTGGAAGG GCAGTGCCTA 540  
 GATATTGATG AATGTCGCTA TGGTTACTGC CAGCAGCTCT GTGCAAATGT TCCAGGATCC 600  
 TATTCCTGTA CATGCAACCC TGGTTTCACC CTCAACGACG ATGGAAGGTC TTGCCAAGAT 660  
 GTGAACGAGT GCGAAACTGA GAATCCCTGT GTTCAGACCT GTGTCAACAC CTATGGCTCT 720  
 TTCATCTGCC GCTGTGACCC AGGATATGAA CTTGAGGAAG ATGGCATTCA CTGCAGTGAT 780  
 ATGGACGAGT GCAGCTTCTC CGAGTTCCTC TGTC AACACG AGTGTGTGAA CCAGCCGGGC 840  
 TCATACTTCT GCTCGTGCCC TCCAGGCTAC GTCCTGTTGG ATGATAACCG AAGCTGCCAG 900  
 GATATCAATG AATGTGAGCA CCGAAACCAC ACGTGTACCT CACTGCAGAC TTGCTACAAT 960  
 CTACAAGGGG GCTTCAAATG TATTGATCCC ATCAGCTGTG AGGAGCCTTA TCTGCTGATT 1020



GGTGAAAACC GCTGTATGTG TCCTGCTGAG CACACCAGCT GCAGAGACCA GCCATTCACC 1080

ATCCTGTATC GGGACATGGA TGTGGTGTCA GGACGCTCCG TTCCTGCTGA CATCTTCCAG 1140

ATGCAAGCAA CAACCCGATA CCCTGGTGCC TATTACATTT TCCAGATCAA ATCTGGCAAC 1200

GAGGGTCGAG AGTTCTATAT GCGGCAAACA GGGCCTATCA GTGCCACCCT GGTGATGACA 1260

CGCCCCATCA AAGGGCCTCG GGACATCCAG CTGGACTTGG AGATGATCAC TGTC AACACT 1320

GTCATCAACT TCAGAGGCAG CTCCGTGATC CGACTGCGGA TATATGTGTC GCAGTATCCG 1380

TTC

1383

SEQ ID NO. : 8

Length : 2429 base pairs

Type : nucleic acid

Strandness : single

Topology : liner

Molecule type : cDNA to mRNA

Original source

Organism : Mus Musculus

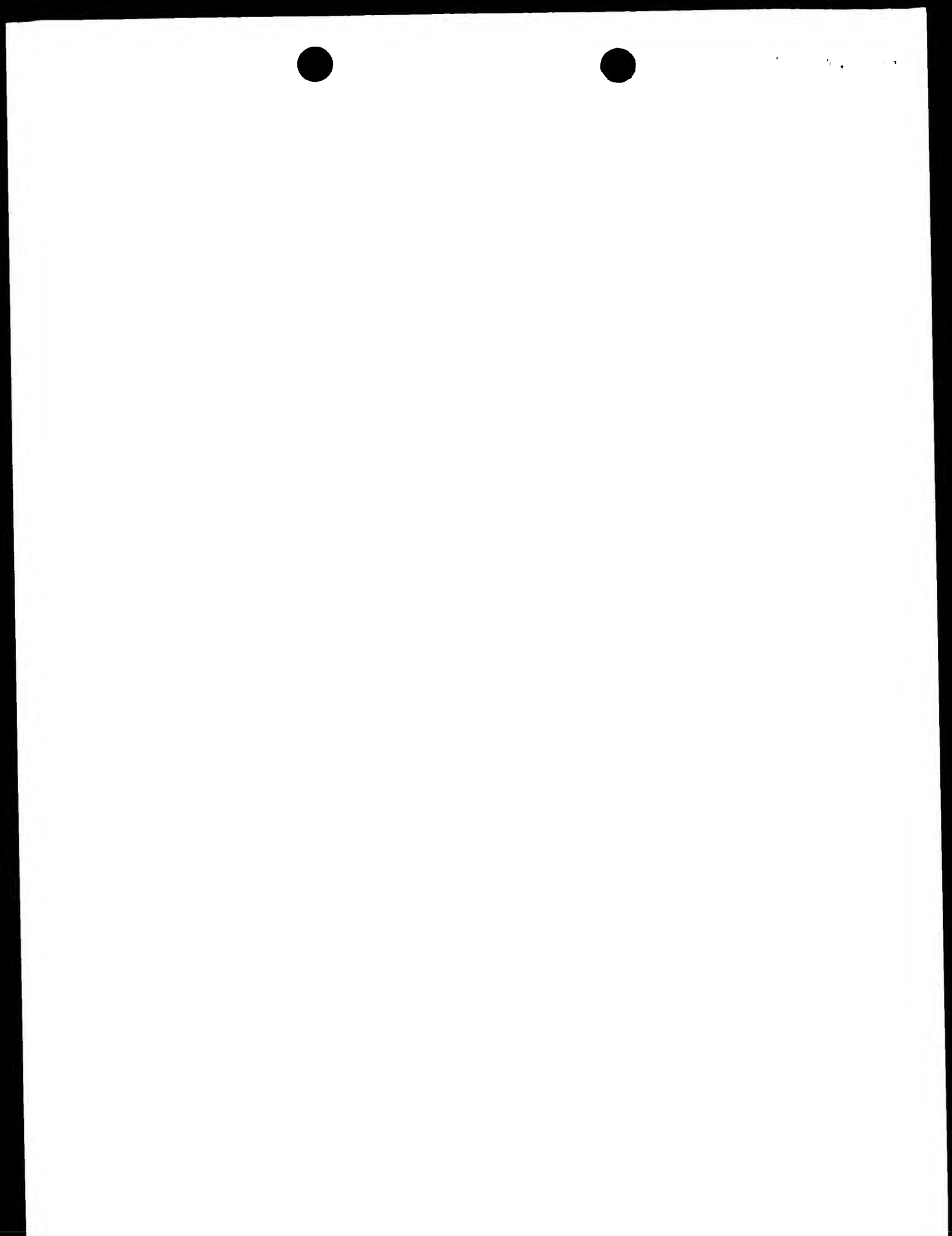
Organelle : day13 embryonic heart

Clone Name : mouse A55b

Feature

Name/Key : CDS

Location : 232..1614



Identification method : S

Name/Key : sig peptide

Location : 232..339

Identification method : S

Name/ Key : mat peptide

Location : 340..1614

Identification method : S

Sequence Description:

CAGCATCTCG AGAGAGGCAG CAGACAACCT CTCTAGGTCA TTTCTCTTTC TTTTGGAAA 60

GGGCAGCAAC GTTGTGCGCA GTTTATAAAA TATCACACTA CATGTTTTTT AAATTTGGGA 120

GACTGCTGAC TACGGCACCA GCAATTGCTT TGCTGCGACG GCTGTGAGAC AAGCAGAAGT 180

CTCCGAACAC TTCTGTCTGC GTTTGCTCTA TGTGTGTGAT TTACAGAGGG A ATG GGA 237

Met Gly

-36 -35

CCT AGA AGT TTC GAG CCA ATG CAC AGT GGA CTC TGC AGA CAG AGA CGC 285

Pro Arg Ser Phe Glu Pro Met His Ser Gly Leu Cys Arg Gln Arg Arg

-30

-25

-20

ATG ATA CTC ACT GTT ACC ATC TTG GCA CTC TGG CTT CCA CAT CCT GGG 333

Met Ile Leu Thr Val Thr Ile Leu Ala Leu Trp Leu Pro His Pro Gly

-15

-10

-5

AAT GCA CAG CAG CAG TGC ACA AAC GGC TTT GAC CTG GAC CGC CAG TCA 381



Asn Ala Gln Gln Gln Cys Thr Asn Gly Phe Asp Leu Asp Arg Gln Ser

1 5 10

GGA CAG TGT CTA GAT ATT GAT GAA TGC CGG ACC ATC CCT GAG GCT TGT 429

Gly Gln Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Thr Ile Pro Glu Ala Cys

15 20 25 30

CGT GGG GAC ATG ATG TGT GTC AAC CAG AAT GGC GGG TAT TTG TGC ATC 477

Arg Gly Asp Met Met Cys Val Asn Gln Asn Gly Gly Tyr Leu Cys Ile

35 40 45

CCT CGA ACC AAC CCA GTG TAT CGA GGG CCT TAC TCA AAT CCC TAC TCT 525

Pro Arg Thr Asn Pro Val Tyr Arg Gly Pro Tyr Ser Asn Pro Tyr Ser

50 55 60

ACA TCC TAC TCA GGC CCA TAC CCA GCA GCG GCC CCA CCA GTA CCA GCT 573

Thr Ser Tyr Ser Gly Pro Tyr Pro Ala Ala Ala Pro Pro Val Pro Ala

65 70 75

TCC AAC TAC CCC ACG ATT TCA AGG CCT CTT GTC TGC CGC TTT GGG TAT 621

Ser Asn Tyr Pro Thr Ile Ser Arg Pro Leu Val Cys Arg Phe Gly Tyr

80 85 90

CAG ATG GAT GAA GGC AAC CAG TGT GTG GAT GTG GAC GAG TGT GCA ACA 669

Gln Met Asp Glu Gly Asn Gln Cys Val Asp Val Asp Glu Cys Ala Thr

95 100 105 110

GAC TCA CAC CAG TGC AAC CCT ACC CAG ATC TGT ATC AAC ACT GAA GGA 717





Asp Ser His Gln Cys Asn Pro Thr Gln Ile Cys Ile Asn Thr Glu Gly	
115 120 125	
GGT TAC ACC TGC TCC TGC ACC GAT GGG TAC TGG CTT CTG GAA GGG CAG	765
Gly Tyr Thr Cys Ser Cys Thr Asp Gly Tyr Trp Leu Leu Glu Gly Gln	
130 135 140	
TGC CTA GAT ATT GAT GAA TGT CGC TAT GGT TAC TGC CAG CAG CTC TGT	813
Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Tyr Gly Tyr Cys Gln Gln Leu Cys	
145 150 155	
GCA AAT GTT CCA GGA TCC TAT TCC TGT ACA TGC AAC CCT GGT TTC ACC	861
Ala Asn Val Pro Gly Ser Tyr Ser Cys Thr Cys Asn Pro Gly Phe Thr	
160 165 170	
CTC AAC GAC GAT GGA AGG TCT TGC CAA GAT GTG AAC GAG TGC GAA ACT	909
Leu Asn Asp Asp Gly Arg Ser Cys Gln Asp Val Asn Glu Cys Glu Thr	
175 180 185 190	
GAG AAT CCC TGT GTT CAG ACC TGT GTC AAC ACC TAT GGC TCT TTC ATC	957
Glu Asn Pro Cys Val Gln Thr Cys Val Asn Thr Tyr Gly Ser Phe Ile	
195 200 205	
TGC CGC TGT GAC CCA GGA TAT GAA CTT GAG GAA GAT GGC ATT CAC TGC	1005
Cys Arg Cys Asp Pro Gly Tyr Glu Leu Glu Glu Asp Gly Ile His Cys	
210 215 220	
AGT GAT ATG GAC GAG TGC AGC TTC TCC GAG TTC CTC TGT CAA CAC GAG	1053



Ser Asp Met Asp Glu Cys Ser Phe Ser Glu Phe Leu Cys Gln His Glu

225

230

235

TGT GTG AAC CAG CCG GGC TCA TAC TTC TGC TCG TGC CCT CCA GGC TAC 1101

Cys Val Asn Gln Pro Gly Ser Tyr Phe Cys Ser Cys Pro Pro Gly Tyr

240

245

250

GTC CTG TTG GAT GAT AAC CGA AGC TGC CAG GAT ATC AAT GAA TGT GAG 1149

Val Leu Leu Asp Asp Asn Arg Ser Cys Gln Asp Ile Asn Glu Cys Glu

255

260

265

270

CAC CGA AAC CAC ACG TGT ACC TCA CTG CAG ACT TGC TAC AAT CTA CAA 1197

His Arg Asn His Thr Cys Thr Ser Leu Gln Thr Cys Tyr Asn Leu Gln

275

280

285

GGG GGC TTC AAA TGT ATT GAT CCC ATC AGC TGT GAG GAG CCT TAT CTG 1245

Gly Gly Phe Lys Cys Ile Asp Pro Ile Ser Cys Glu Glu Pro Tyr Leu

290

295

300

CTG ATT GGT GAA AAC CGC TGT ATG TGT CCT GCT GAG CAC ACC AGC TGC 1293

Leu Ile Gly Glu Asn Arg Cys Met Cys Pro Ala Glu His Thr Ser Cys

305

310

315

AGA GAC CAG CCA TTC ACC ATC CTG TAT CGG GAC ATG GAT GTG GTG TCA 1341

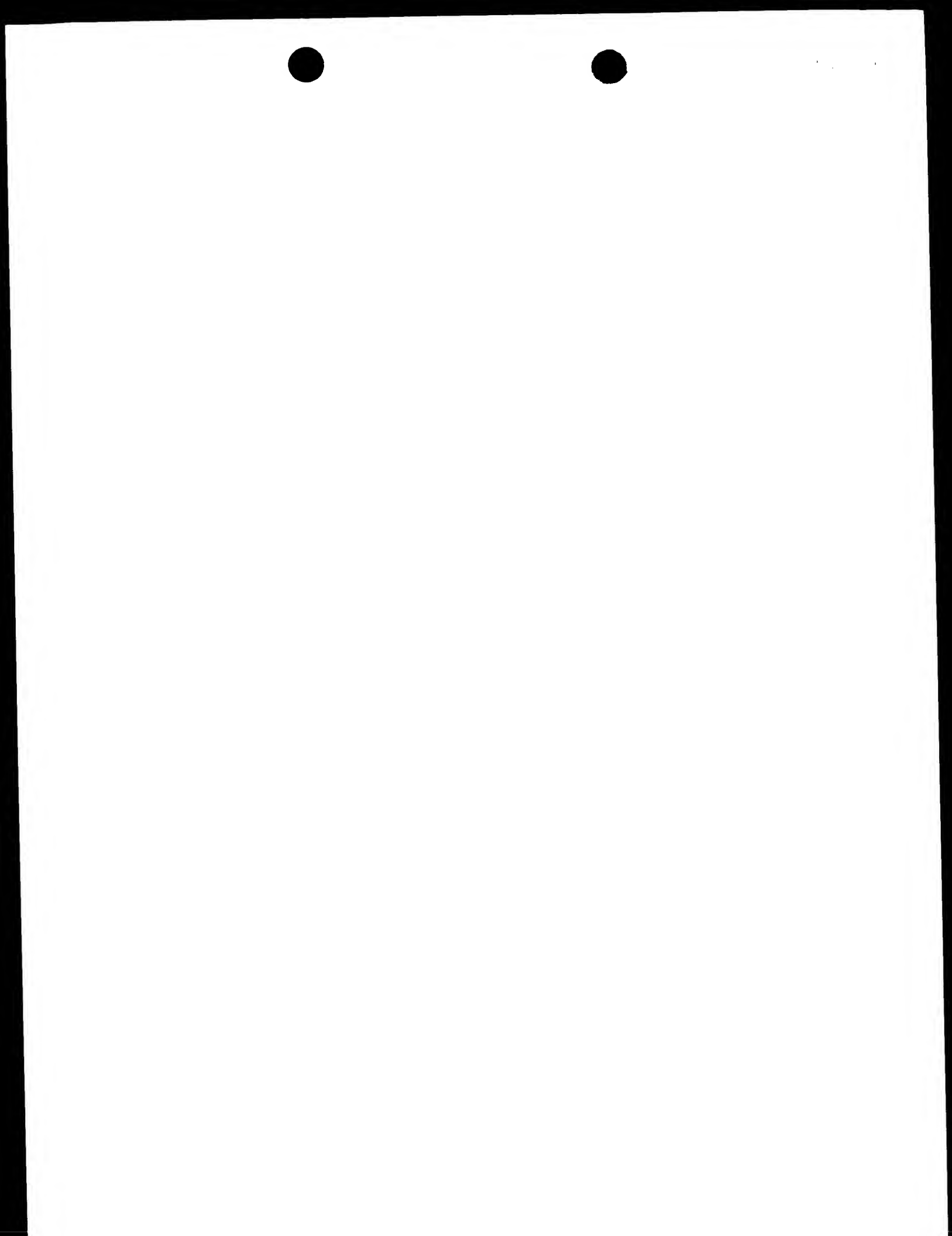
Arg Asp Gln Pro Phe Thr Ile Leu Tyr Arg Asp Met Asp Val Val Ser

320

325

330

GGA CGC TCC GTT CCT GCT GAC ATC TTC CAG ATG CAA GCA ACA ACC CGA 1389



Gly Arg Ser Val Pro Ala Asp Ile Phe Gln Met Gln Ala Thr Thr Arg

335

340

345

350

TAC CCT GGT GCC TAT TAC ATT TTC CAG ATC AAA TCT GGC AAC GAG GGT 1437

Tyr Pro Gly Ala Tyr Tyr Ile Phe Gln Ile Lys Ser Gly Asn Glu Gly

355

360

365

CGA GAG TTC TAT ATG CGG CAA ACA GGG CCT ATC AGT GCC ACC CTG GTG 1485

Arg Glu Phe Tyr Met Arg Gln Thr Gly Pro Ile Ser Ala Thr Leu Val

370

375

380

ATG ACA CGC CCC ATC AAA GGG CCT CGG GAC ATC CAG CTG GAC TTG GAG 1533

Met Thr Arg Pro Ile Lys Gly Pro Arg Asp Ile Gln Leu Asp Leu Glu

385

390

395

ATG ATC ACT GTC AAC ACT GTC ATC AAC TTC AGA GGC AGC TCC GTG ATC 1581

Met Ile Thr Val Asn Thr Val Ile Asn Phe Arg Gly Ser Ser Val Ile

400

405

410

CGA CTG CGG ATA TAT GTG TCG CAG TAT CCG TTC TGAGCCTCTG GCTAAGGCCT 1634

Arg Leu Arg Ile Tyr Val Ser Gln Tyr Pro Phe

415

420

425

CTGACACTGC CTTTCACCAG CACCGAGGGA CGGGAGGAGA AAGGAAACCA GCAAGAATGA 1694

GAGCGAGACA GACATTGCAC CTTTCCTGCT GAATATCTCC TGGGGGCATC AGCCTAGCAT 1754

CTTGACCCAT ATCTGTACTA TTGCAGATGG TCACTCTGAA GGACACCCTG CCCTCAGTTC 1814



CTATGATGCA GTTATCCAAA AGTGTTTCATC TTAGCCCCTG ATATGAGGTT GCCAGTGACT 1874  
 CTTCAAAGCC TTCCATTTAT TTCCATCGTT TTATAAAAAA GAAAATAGAT TAGATTTGCT 1934  
 GGGGTATGAG TCCTCGAAGG TTCAAAAGAC TGAGTGGCTT GCTCTCACCT CTCCTCTCC 1994  
 TTCCTCCATC TCTTGCTGCA TTGCTGCTTT GCAAAAGTCC TCATGGGCTC GTGGGAAATG 2054  
 CTGGGAATAG CTAGTTTGCT TCTTGCAATG TCTGAGAAGG CTATGGGAAC ACACCACAGC 2114  
 AGGATCGAAG GTTTTTATAG AGTCTATTTT AAAATCACAT CTGGTATTTT CAGCATAAAA 2174  
 GAAATTTTAG TTGTCTTTAA AATTTGTATG AGTGTTTAAC CTTTCTTAT TCATTTTGAG 2234  
 GCTTCTTAAA GTGGTAGAAT TCCTTCCAAA GGCCTCAGAT ACATGTTATG TTCAGTCTTT 2294  
 CCAACCTCAT CCTTCCTGC ATCTTAGCCC AGTTTTTACG AAGACCCCTT AATCATGCTT 2354  
 TNTTAAGAGT TTTTACCCAA CTGCGTTGGA AGACAGAGGT ATCCAGACTG ATTAAATAAT 2414  
 TGAAGAAAAA AAAAA 2429

SEQ ID NO. : 9

Length : 423 amino acids

Type : amino acid

Topology : liner

Molecule type : protein





Sequence Description :

Gln Cys Thr Asn Gly Phe Asp Leu Asp Arg Gln Ser Gly Gln Cys Leu

1 5 10 15

Asp Ile Asp Glu Cys Arg Thr Ile Pro Glu Ala Cys Arg Gly Asp Met

20 25 30

Met Cys Val Asn Gln Asn Gly Gly Tyr Leu Cys Ile Pro Arg Thr Asn

35 40 45

Pro Val Tyr Arg Gly Pro Tyr Ser Asn Pro Tyr Ser Thr Ser Tyr Ser

50 55 60

Gly Pro Tyr Pro Ala Ala Ala Pro Pro Val Pro Ala Ser Asn Tyr Pro

65 70 75 80

Thr Ile Ser Arg Pro Leu Val Cys Arg Phe Gly Tyr Gln Met Asp Glu

85 90 95

Gly Asn Gln Cys Val Asp Val Asp Glu Cys Ala Thr Asp Ser His Gln

100 105 110

Cys Asn Pro Thr Gln Ile Cys Ile Asn Thr Glu Gly Gly Tyr Thr Cys

115 120 125

Ser Cys Thr Asp Gly Tyr Trp Leu Leu Glu Gly Gln Cys Leu Asp Ile

130 135 140



Asp Glu Cys Arg Tyr Gly Tyr Cys Gln Gln Leu Cys Ala Asn Val Pro

145

150

155

160

Gly Ser Tyr Ser Cys Thr Cys Asn Pro Gly Phe Thr Leu Asn Asp Asp

165

170

175

Gly Arg Ser Cys Gln Asp Val Asn Glu Cys Glu Thr Glu Asn Pro Cys

180

185

190

Val Gln Thr Cys Val Asn Thr Tyr Gly Ser Phe Ile Cys Arg Cys Asp

195

200

205

Pro Gly Tyr Glu Leu Glu Glu Asp Gly Ile His Cys Ser Asp Met Asp

210

215

220

Glu Cys Ser Phe Ser Glu Phe Leu Cys Gln His Glu Cys Val Asn Gln

225

230

235

240

Pro Gly Ser Tyr Phe Cys Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Val Leu Leu Asp

245

250

255

Asp Asn Arg Ser Cys Gln Asp Ile Asn Glu Cys Glu His Arg Asn His

260

265

270

Thr Cys Thr Ser Leu Gln Thr Cys Tyr Asn Leu Gln Gly Gly Phe Lys

275

280

285



Cys Ile Asp Pro Ile Ser Cys Glu Glu Pro Tyr Leu Leu Ile Gly Glu

290

295

300

Asn Arg Cys Met Cys Pro Ala Glu His Thr Ser Cys Arg Asp Gln Pro

305

310

315

320

Phe Thr Ile Leu Tyr Arg Asp Met Asp Val Val Ser Gly Arg Ser Val

325

330

335

Pro Ala Asp Ile Phe Gln Met Gln Ala Thr Thr Arg Tyr Pro Gly Ala

340

345

350

Tyr Tyr Ile Phe Gln Ile Lys Ser Gly Asn Glu Gly Arg Glu Phe Tyr

355

360

365

Met Arg Gln Thr Gly Pro Ile Ser Ala Thr Leu Val Met Thr Arg Pro

370

375

380

Ile Lys Gly Pro Arg Asp Ile Gln Leu Asp Leu Glu Met Ile Thr Val

385

390

395

400

Asn Thr Val Ile Asn Phe Arg Gly Ser Ser Val Ile Arg Leu Arg Ile

405

410

415

Tyr Val Ser Gln Tyr Pro Phe

420

SEQ ID NO. : 10



Length : 1269 base pairs

Type : nucleic acid

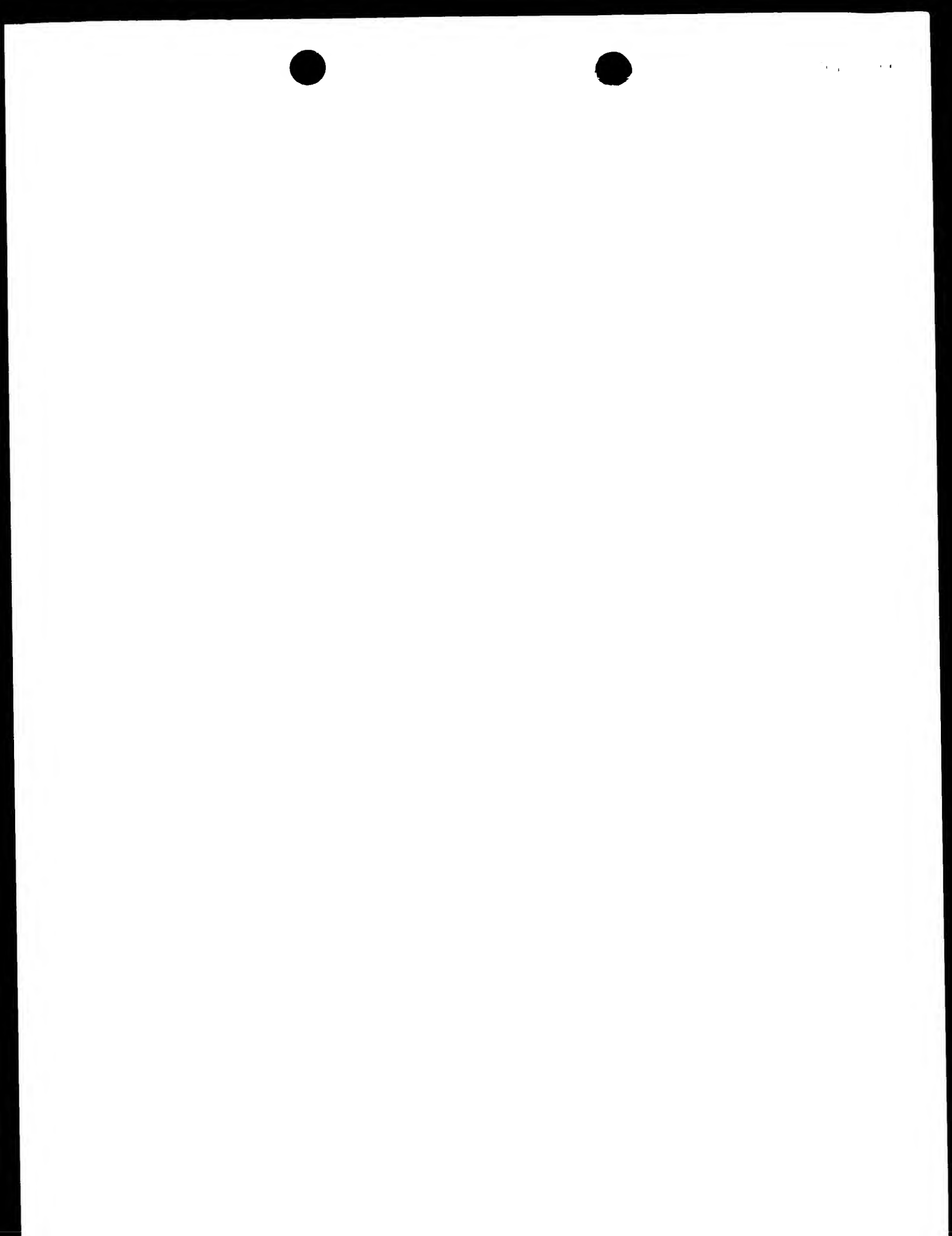
Strandness : single

Topology : liner

Molecule type : cDNA to mRNA

Sequence Description :

CAGTGCACAA ACGGCTTTGA CCTGGACCGC CAGTCAGGAC AGTGTCTAGA TATTGATGAA	60
TGCCGGACCA TCCCTGAGGC TTGTCGTGGG GACATGATGT GTGTCAACCA GAATGGCGGG	120
TATTTGTGCA TCCCTCGAAC CAACCCAGTG TATCGAGGGC CTTACTCAA TCCCTACTCT	180
ACATCCTACT CAGGCCCATATA CCCAGCAGCG GCCCCACCAG TACCAGCTTC CAACTACCCC	240
ACGATTTCAA GGCCTCTTGT CTGCCGCTTT GGGTATCAGA TGGATGAAGG CAACCAGTGT	300
GTGGATGTGG ACGAGTGTGC AACAGACTCA CACCAGTGCA ACCCTACCCA GATCTGTATC	360
AACACTGAAG GAGGTTACAC CTGCTCCTGC ACCGATGGGT ACTGGCTTCT GGAAGGGCAG	420
TGCCTAGATA TTGATGAATG TCGCTATGGT TACTGCCAGC AGCTCTGTGC AAATGTTCCA	480
GGATCCTATT CCTGTACATG CAACCCTGGT TTCACCCTCA ACGACGATGG AAGGTCTTGC	540
CAAGATGTGA ACGAGTGCGA AACTGAGAAT CCCTGTGTTC AGACCTGTGT CAACACCTAT	600
GGCTCTTTCA TCTGCCGCTG TGACCCAGGA TATGAACTTG AGGAAGATGG CATTCCTGC	660





AGTGATATGG ACGAGTGCAG CTTCTCCGAG TTCCTCTGTC AACACGAGTG TGTGAACCAG 720  
 CCGGGCTCAT ACTTCTGCTC GTGCCCTCCA GGCTACGTCC TGTGGGATGA TAACCGAAGC 780  
 TGCCAGGATA TCAATGAATG TGAGCACCGA AACCACACGT GTACCTCACT GCAGACTTGC 840  
 TACAATCTAC AAGGGGGCTT CAAATGTATT GATCCCATCA GCTGTGAGGA GCCTTATCTG 900  
 CTGATTGGTG AAAACCGCTG TATGTGTCCT GCTGAGCACA CCAGCTGCAG AGACCAGCCA 960  
 TTCACCATCC TGTATCGGGA CATGGATGTG GTGTCAGGAC GCTCCGTTCC TGCTGACATC 1020  
 TTCCAGATGC AAGCAACAAC CCGATACCCT GGTGCCTATT ACATTTTCCA GATCAAATCT 1080  
 GGCAACGAGG GTCGAGAGTT CTATATGCGG CAAACAGGGC CTATCAGTGC CACCCTGGTG 1140  
 ATGACACGCC CCATCAAAGG GCCTCGGGAC ATCCAGCTGG ACTTGGAGAT GATCACTGTC 1200  
 AACACTGTCA TCAACTTCAG AGGCAGCTCC GTGATCCGAC TCGGGATATA TGTGTCGCAG 1260  
 TATCCGTTTC 1269

SEQ ID NO. : 11

Length : 448 amino acids

Type : amino acid

Topology : liner

Molecule type : protein



Sequence Description :

Met Pro Gly Ile Lys Arg Ile Leu Thr Val Thr Ile Leu Ala Leu Cys

-23                -20                        -15                        -10

Leu Pro Ser Pro Gly Asn Ala Gln Ala Gln Cys Thr Asn Gly Phe Asp

-5                                1                                5

Leu Asp Arg Gln Ser Gly Gln Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Thr

10                                15                                20                                25

Ile Pro Glu Ala Cys Arg Gly Asp Met Met Cys Val Asn Gln Asn Gly

30                                35                                40

Gly Tyr Leu Cys Ile Pro Arg Thr Asn Pro Val Tyr Arg Gly Pro Tyr

45                                50                                55

Ser Asn Pro Tyr Ser Thr Pro Tyr Ser Gly Pro Tyr Pro Ala Ala Ala

60                                65                                70

Pro Pro Leu Ser Ala Pro Asn Tyr Pro Thr Ile Ser Arg Pro Leu Ile

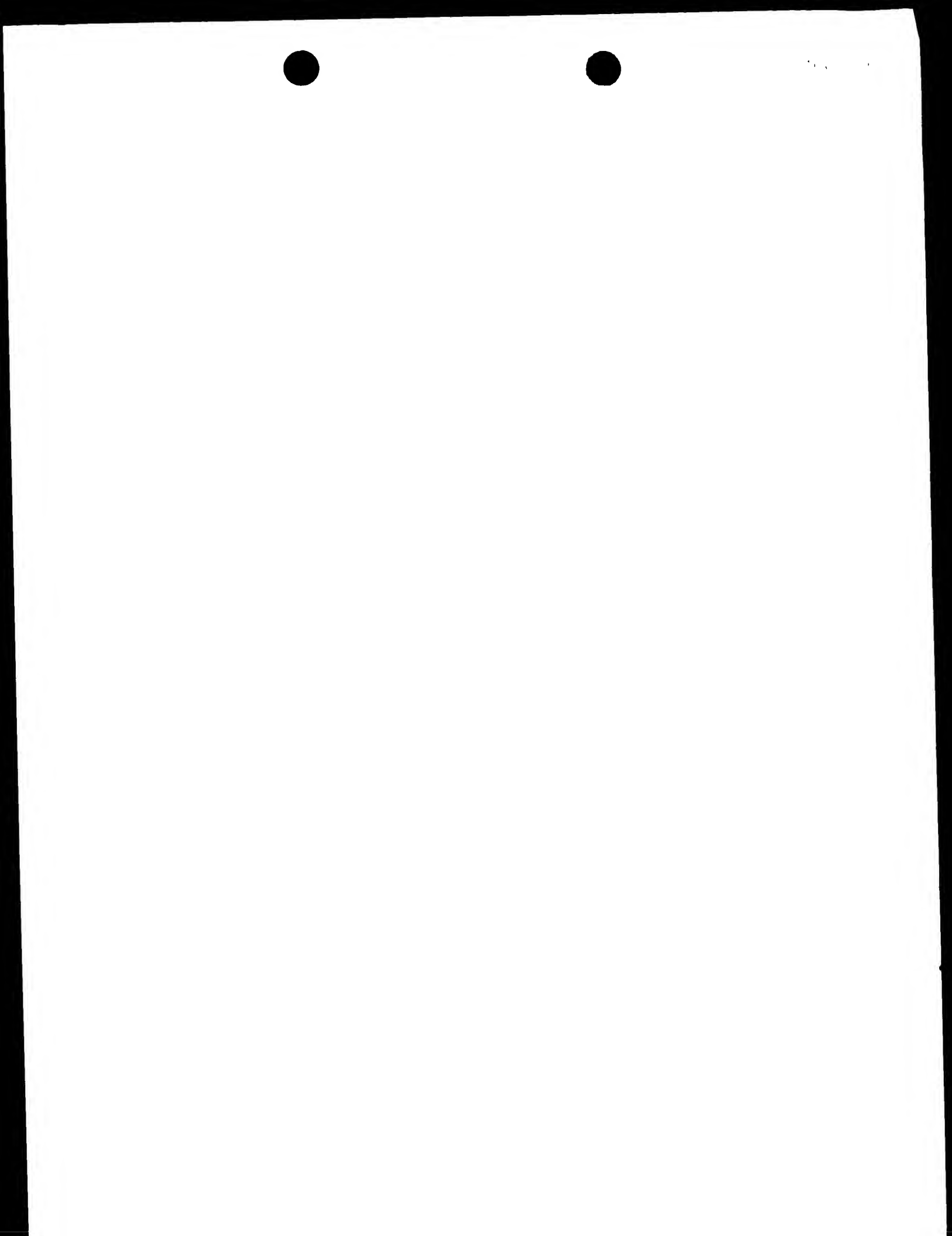
75                                80                                85

Cys Arg Phe Gly Tyr Gln Met Asp Glu Ser Asn Gln Cys Val Asp Val

90                                95                                100                                105

Asp Glu Cys Ala Thr Asp Ser His Gln Cys Asn Pro Thr Gln Ile Cys

110                                115                                120



Ile Asn Thr Glu Gly Gly Tyr Thr Cys Ser Cys Thr Asp Gly Tyr Trp  
125 130 135

Leu Leu Glu Gly Gln Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Tyr Gly Tyr  
140 145 150

Cys Gln Gln Leu Cys Ala Asn Val Pro Gly Ser Tyr Ser Cys Thr Cys  
155 160 165

Asn Pro Gly Phe Thr Leu Asn Glu Asp Gly Arg Ser Cys Gln Asp Val  
170 175 180 185

Asn Glu Cys Ala Thr Glu Asn Pro Cys Val Gln Thr Cys Val Asn Thr  
190 195 200

Tyr Gly Ser Phe Ile Cys Arg Cys Asp Pro Gly Tyr Glu Leu Glu Glu  
205 210 215

Asp Gly Val His Cys Ser Asp Met Asp Glu Cys Ser Phe Ser Glu Phe  
220 225 230

Leu Cys Gln His Glu Cys Val Asn Gln Pro Gly Thr Tyr Phe Cys Ser  
235 240 245

Cys Pro Pro Gly Tyr Ile Leu Leu Asp Asp Asn Arg Ser Cys Gln Asp  
250 255 260 265



Ile Asn Glu Cys Glu His Arg Asn His Thr Cys Asn Leu Gln Gln Thr  
270 275 280

Cys Tyr Asn Leu Gln Gly Gly Phe Lys Cys Ile Asp Pro Ile Arg Cys  
285 290 295

Glu Glu Pro Tyr Leu Arg Ile Ser Asp Asn Arg Cys Met Cys Pro Ala  
300 305 310

Glu Asn Pro Gly Cys Arg Asp Gln Pro Phe Thr Ile Leu Tyr Arg Asp  
315 320 325

Met Asp Val Val Ser Gly Arg Ser Val Pro Ala Asp Ile Phe Gln Met  
330 335 340 345

Gln Ala Thr Thr Arg Tyr Pro Gly Ala Tyr Tyr Ile Phe Gln Ile Lys  
350 355 360

Ser Gly Asn Glu Gly Arg Glu Phe Tyr Met Arg Gln Thr Gly Pro Ile  
365 370 375

Ser Ala Thr Leu Val Met Thr Arg Pro Ile Lys Gly Pro Arg Glu Ile  
380 385 390

Gln Leu Asp Leu Glu Met Ile Thr Val Asn Thr Val Ile Asn Phe Arg  
395 400 405

Gly Ser Ser Val Ile Arg Leu Arg Ile Tyr Val Ser Gln Tyr Pro Phe





410

415

420

425

SEQ ID NO. : 12

Length : 1344 base pairs

Type : nucleic acid

Strandness : single

Topology : liner

Molecule type : cDNA to mRNA

Sequence Description :

ATGCCAGGAA TAAAAAGGAT ACTCACTGTT ACCATTCTGG CTCTCTGTCT TCCAAGCCCT 60

GGGAATGCAC AGGCACAGTG CACGAATGGC TTTGACCTGG ATCGCCAGTC AGGACAGTGT 120

TTAGATATTG ATGAATGCCG AACCATCCCC GAGGCCTGCC GAGGAGACAT GATGTGTGTT 180

AACCAAAATG GCGGGTATTT ATGCATTCCC CGGACAAACC CTGTGTATCG AGGGCCCTAC 240

TCGAACCCCT ACTCGACCCC CTACTCAGGT CCGTACCCAG CAGCTGCCCC ACCACTCTCA 300

GCTCCAAACT ATCCCACGAT CTCCAGGCCT CTTATATGCC GCTTTGGATA CCAGATGGAT 360

GAAAGCAACC AATGTGTGGA TGTGGACGAG TGTGCAACAG ATTCCCACCA GTGCAACCCC 420

ACCCAGATCT GCATCAATAC TGAAGGCGGG TACACCTGCT CCTGCACCGA CGGATATTGG 480

CTTCTGGAAG GCCAGTGCTT AGACATTGAT GAATGTCGCT ATGGTTACTG CCAGCAGCTC 540



Page 11

TGTGCGAATG TTCCTGGATC CTATTCTTGT ACATGCAACC CTGGTTTTAC CCTCAATGAG 600  
 GATGGAAGGT CTTGCCAAGA TGTGAACGAG TGTGCCACCG AGAACCCTG CGTGCAAACC 660  
 TCGTCAACA CCTACGGCTC TTTCATCTGC CGCTGTGACC CAGGATATGA ACTTGAGGAA 720  
 GATGGCGTTC ATTGCAGTGA TATGGACGAG TGCAGCTTCT CTGAGTTCCT CTGCCAACAT 780  
 GAGTGTGTGA ACCAGCCCGG CACATACTTC TGCTCCTGCC CTCCAGGCTA CATCCTGCTG 840  
 GATGACAACC GAAGCTGCCA AGACATCAAC GAATGTGAGC ACAGGAACCA CACGTGCAAC 900  
 CTGCAGCAGA CGTGCTACAA TTTACAAGGG GGCTTCAAAT GCATCGACCC CATCCGCTGT 960  
 GAGGAGCCTT ATCTGAGGAT CAGTGATAAC CGCTGTATGT GTCCTGCTGA GAACCCTGGC 1020  
 TGCAGAGACC AGCCCTTTAC CATCTTGTA C GGGACATGG ACGTGGTGTC AGGACGCTCC 1080  
 GTTCCCGCTG ACATCTTCCA AATGCAAGCC ACGACCCGCT ACCCTGGGGC CTATTACATT 1140  
 TTCCAGATCA AATCTGGGAA TGAGGGCAGA GAATTTTACA TGC GGCAAAC GGGCCCCATC 1200  
 AGTGCCACCC TGGTGATGAC ACGCCCCATC AAAGGGCCCC GGGAAATCCA GCTGGACTTG 1260  
 GAAATGATCA CTGTCAACAC TGTCATCAAC TTCAGAGGCA GCTCCGTGAT CCGACTGCGG 1320  
 ATATATGTGT CGCAGTACCC ATTC 1344



...

SEQ ID NO. : 13

Length : 2328 base pairs

Type : nucleic acid

Strandness : single

Topology : liner

Molecule type : cDNA to mRNA

Original source

Organism : Homo Sapiens

Organelle : human brain

Clone Name : human A55

#### Feature

Name/Key : CDS

Location : 169..1512

Identification method : S

Name/Key : sig peptide

Location : 169..237

Identification method : S

Name/ Key : mat peptide

Location : 238..1512

Identification method : S

#### Sequence Description :

GACCCGGCGC TCTCCCCGTG TCCTCTCCAC GACTCGCTCG GCCCTCTGG AATAAAACAC 60

CCGCGAGCCC CGAGGGCCCA GAGGAGGCCG ACGTGCCCGA GCTCCTCCGG GGGTCCCGCC 120

CGCGAGCTTT CTTCTCGCCT TCGCATCTCC TCCTCGCGCG TCTTGGAC ATG CCA GGA 177

Met Pro Gly



ATA AAA AGG ATA CTC ACT GTT ACC ATT CTG GCT CTC TGT CTT CCA AGC 225  
 Ile Lys Arg Ile Leu Thr Val Thr Ile Leu Ala Leu Cys Leu Pro Ser  
 -20 -15 -10 -5

CCT GGG AAT GCA CAG GCA CAG TGC ACG AAT GGC TTT GAC CTG GAT CGC 273  
 Pro Gly Asn Ala Gln Ala Gln Cys Thr Asn Gly Phe Asp Leu Asp Arg  
 1 5 10

CAG TCA GGA CAG TGT TTA GAT ATT GAT GAA TGC CGA ACC ATC CCC GAG 321  
 Gln Ser Gly Gln Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Thr Ile Pro Glu  
 15 20 25

GCC TGC CGA GGA GAC ATG ATG TGT GTT AAC CAA AAT GGC GGG TAT TTA 369  
 Ala Cys Arg Gly Asp Met Met Cys Val Asn Gln Asn Gly Gly Tyr Leu  
 30 35 40

TGC ATT CCC CGG ACA AAC CCT GTG TAT CGA GGG CCC TAC TCG AAC CCC 417  
 Cys Ile Pro Arg Thr Asn Pro Val Tyr Arg Gly Pro Tyr Ser Asn Pro  
 45 50 55 60

TAC TCG ACC CCC TAC TCA GGT CCG TAC CCA GCA GCT GCC CCA CCA CTC 465  
 Tyr Ser Thr Pro Tyr Ser Gly Pro Tyr Pro Ala Ala Ala Pro Pro Leu  
 65 70 75

TCA GCT CCA AAC TAT CCC ACG ATC TCC AGG CCT CTT ATA TGC CGC TTT 513  
 Ser Ala Pro Asn Tyr Pro Thr Ile Ser Arg Pro Leu Ile Cys Arg Phe





80

85

90

GGA TAC CAG ATG GAT GAA AGC AAC CAA TGT GTG GAT GTG GAC GAG TGT 561

Gly Tyr Gln Met Asp Glu Ser Asn Gln Cys Val Asp Val Asp Glu Cys

95

100

105

GCA ACA GAT TCC CAC CAG TGC AAC CCC ACC CAG ATC TGC ATC AAT ACT 609

Ala Thr Asp Ser His Gln Cys Asn Pro Thr Gln Ile Cys Ile Asn Thr

110

115

120

GAA GGC GGG TAC ACC TGC TCC TGC ACC GAC GGA TAT TGG CTT CTG GAA 657

Glu Gly Gly Tyr Thr Cys Ser Cys Thr Asp Gly Tyr Trp Leu Leu Glu

125

130

135

140

GGC CAG TGC TTA GAC ATT GAT GAA TGT CGC TAT GGT TAC TGC CAG CAG 705

Gly Gln Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Tyr Gly Tyr Cys Gln Gln

145

150

155

CTC TGT GCG AAT GTT CCT GGA TCC TAT TCT TGT ACA TGC AAC CCT GGT 753

Leu Cys Ala Asn Val Pro Gly Ser Tyr Ser Cys Thr Cys Asn Pro Gly

160

165

170

TTT ACC CTC AAT GAG GAT GGA AGG TCT TGC CAA GAT GTG AAC GAG TGT 801

Phe Thr Leu Asn Glu Asp Gly Arg Ser Cys Gln Asp Val Asn Glu Cys

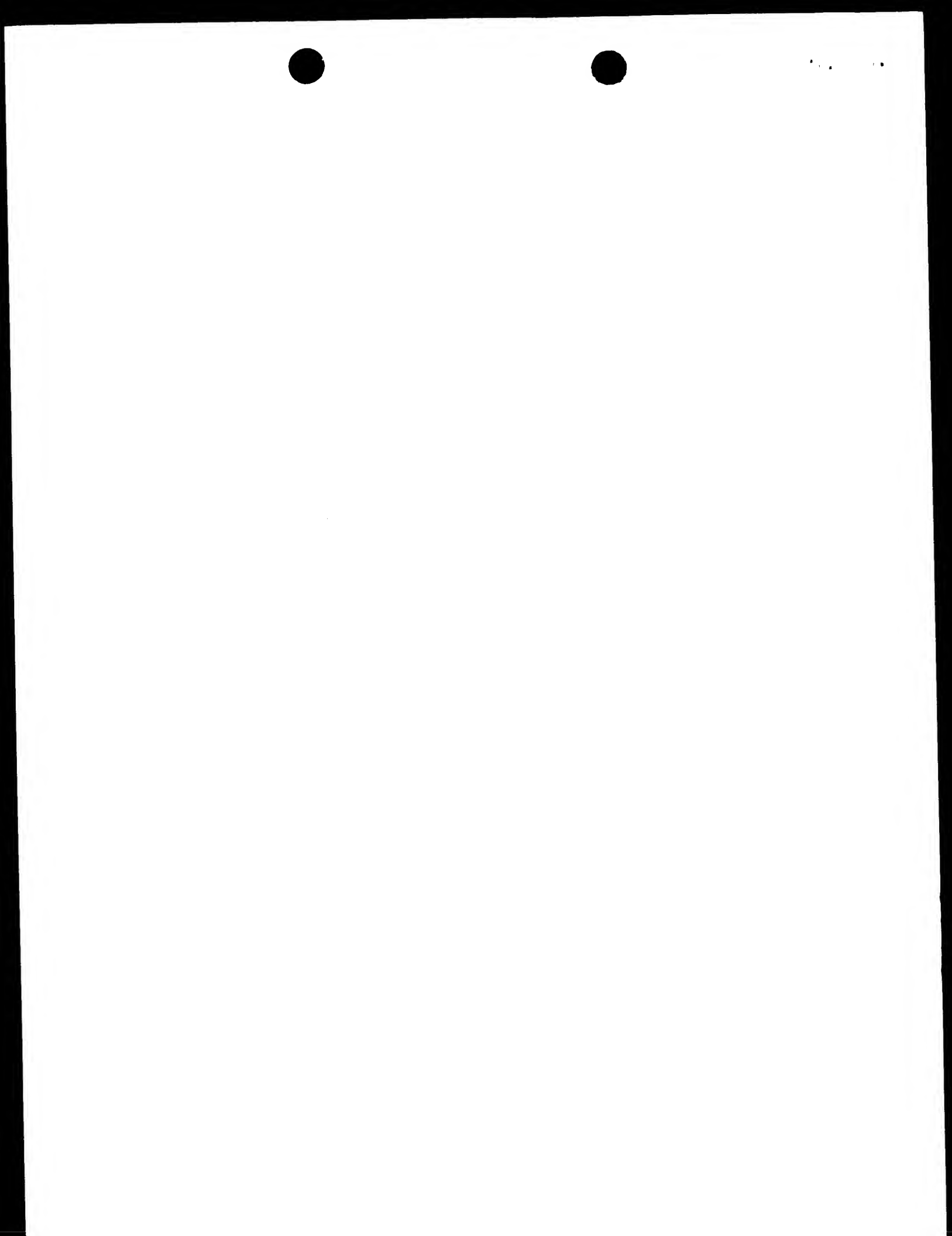
175

180

185

GCC ACC GAG AAC CCC TGC GTG CAA ACC TGC GTC AAC ACC TAC GGC TCT 849

Ala Thr Glu Asn Pro Cys Val Gln Thr Cys Val Asn Thr Tyr Gly Ser



190

195

200

TTC ATC TGC CGC TGT GAC CCA GGA TAT GAA CTT GAG GAA GAT GGC GTT 897  
 Phe Ile Cys Arg Cys Asp Pro Gly Tyr Glu Leu Glu Glu Asp Gly Val  
 205 210 215 220

CAT TGC AGT GAT ATG GAC GAG TGC AGC TTC TCT GAG TTC CTC TGC CAA 945  
 His Cys Ser Asp Met Asp Glu Cys Ser Phe Ser Glu Phe Leu Cys Gln  
 225 230 235

CAT GAG TGT GTG AAC CAG CCC GGC ACA TAC TTC TGC TCC TGC CCT CCA 993  
 His Glu Cys Val Asn Gln Pro Gly Thr Tyr Phe Cys Ser Cys Pro Pro  
 240 245 250

GGC TAC ATC CTG CTG GAT GAC AAC CGA AGC TGC CAA GAC ATC AAC GAA 1041  
 Gly Tyr Ile Leu Leu Asp Asp Asn Arg Ser Cys Gln Asp Ile Asn Glu  
 255 260 265

TGT GAG CAC AGG AAC CAC ACG TGC AAC CTG CAG CAG ACG TGC TAC AAT 1089  
 Cys Glu His Arg Asn His Thr Cys Asn Leu Gln Gln Thr Cys Tyr Asn  
 270 275 280

TTA CAA GGG GGC TTC AAA TGC ATC GAC CCC ATC CGC TGT GAG GAG CCT 1137  
 Leu Gln Gly Gly Phe Lys Cys Ile Asp Pro Ile Arg Cys Glu Glu Pro  
 285 290 295 300

TAT CTG AGG ATC AGT GAT AAC CGC TGT ATG TGT CCT GCT GAG AAC CCT 1185  
 Tyr Leu Arg Ile Ser Asp Asn Arg Cys Met Cys Pro Ala Glu Asn Pro



305

310

315

GGC TGC AGA GAC CAG CCC TTT ACC ATC TTG TAC CGG GAC ATG GAC GTG 1233

Gly Cys Arg Asp Gln Pro Phe Thr Ile Leu Tyr Arg Asp Met Asp Val

320

325

330

GTG TCA GGA CGC TCC GTT CCC GCT GAC ATC TTC CAA ATG CAA GCC ACG 1281

Val Ser Gly Arg Ser Val Pro Ala Asp Ile Phe Gln Met Gln Ala Thr

335

340

345

ACC CGC TAC CCT GGG GCC TAT TAC ATT TTC CAG ATC AAA TCT GGG AAT 1329

Thr Arg Tyr Pro Gly Ala Tyr Tyr Ile Phe Gln Ile Lys Ser Gly Asn

350

355

360

GAG GGC AGA GAA TTT TAC ATG CGG CAA ACG GGC CCC ATC AGT GCC ACC 1377

Glu Gly Arg Glu Phe Tyr Met Arg Gln Thr Gly Pro Ile Ser Ala Thr

365

370

375

380

CTG GTG ATG ACA CGC CCC ATC AAA GGG CCC CGG GAA ATC CAG CTG GAC 1425

Leu Val Met Thr Arg Pro Ile Lys Gly Pro Arg Glu Ile Gln Leu Asp

385

390

395

TTG GAA ATG ATC ACT GTC AAC ACT GTC ATC AAC TTC AGA GGC AGC TCC 1473

Leu Glu Met Ile Thr Val Asn Thr Val Ile Asn Phe Arg Gly Ser Ser

400

405

410

GTG ATC CGA CTG CGG ATA TAT GTG TCG CAG TAC CCA TTC TGAGCCTCGG 1522

Val Ile Arg Leu Arg Ile Tyr Val Ser Gln Tyr Pro Phe



415

420

425

GCTGGAGCCT CCGACGCTGC CTCTCATTGG CACCAAGGGA CAGGAGAAGA GAGGAAATAA 1582

CAGAGAGAAT GAGAGCGACA CAGACGTTAG GCATTTCTCTG CTGAACGTTT CCCCGAAGAG 1642

TCAGCCCCGA CTCCTGACT CTCACCTGTA CTATTGCAGA CCTGTCACCC TGCAGGACTT 1702

GCCACCCCCA GTTCCTATGA TACAGTTATC AAAAAGTATT ATCATTGCTC CCCTGATAGA 1762

AGATTGTTGG TGAATTTTCA AGGCCTTCAG TTTATTTCCA CTATTTTCAA AGAAAATAGA 1822

TTAGGTTTGC GGGGGTCTGA GTCTATGTTT AAAGACTGTG AACAGCTTGC TGTCACCTTCT 1882

TCACCTCTTC CACTCCTTCT CTCACTGTGT TACTGCTTTG CAAAGACCCG GGAGCTGGCG 1942

GGGAACCCTG GGAGTAGCTA GTTGCTTTT TCGGTACACA GAGAAGGCTA TGTAACAAA 2002

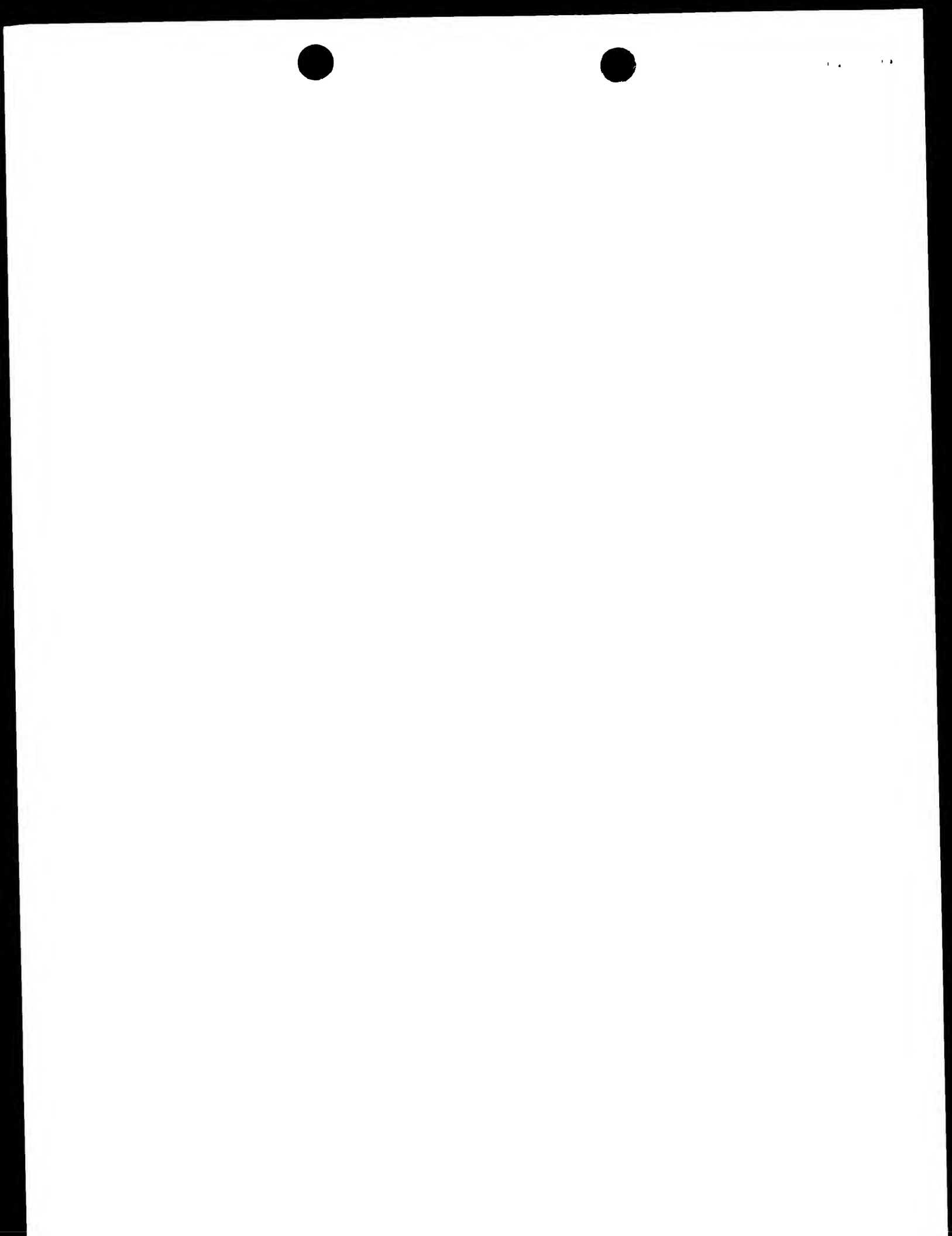
CCACAGCAGG ATCGAAGGGT TTTTAGAGAA TGTGTTTCAA AACCATGCCT GGTATTTTCA 2062

ACCATAAAAG AAGTTTCAGT TGTCTTAAA TTTGTATAAC GGTTTAATTC TGTCTTGTTT 2122

ATTTTGAGTA TTTTAAAAA ATATGTCGTA GAATTCCTTC GAAAGGCCTT CAGACACATG 2182

CTATGTTCTG TCTTCCCAA CCCAGTCTCC TCTCCATTTT AGCCCAGTGT TTTCTTTGAG 2242

GACCCCTTAA TCTTGCTTTC TTTAGAATTT TTACCCAATT GGATTGGAAT GCAGAGGTCT 2302





CCAAACTGAT TAAATATTTG AAGAGA

2328

SEQ ID NO. : 14

Length : 423 amino acids

Type : amino acid

Topology : liner

Molecule type : protein

Sequence Description :

Gln Cys Thr Asn Gly Phe Asp Leu Asp Arg Gln Ser Gly Gln Cys Leu

1 5 10 15

Asp Ile Asp Glu Cys Arg Thr Ile Pro Glu Ala Cys Arg Gly Asp Met

20 25 30

Met Cys Val Asn Gln Asn Gly Gly Tyr Leu Cys Ile Pro Arg Thr Asn

35 40 45

Pro Val Tyr Arg Gly Pro Tyr Ser Asn Pro Tyr Ser Thr Pro Tyr Ser

50 55 60

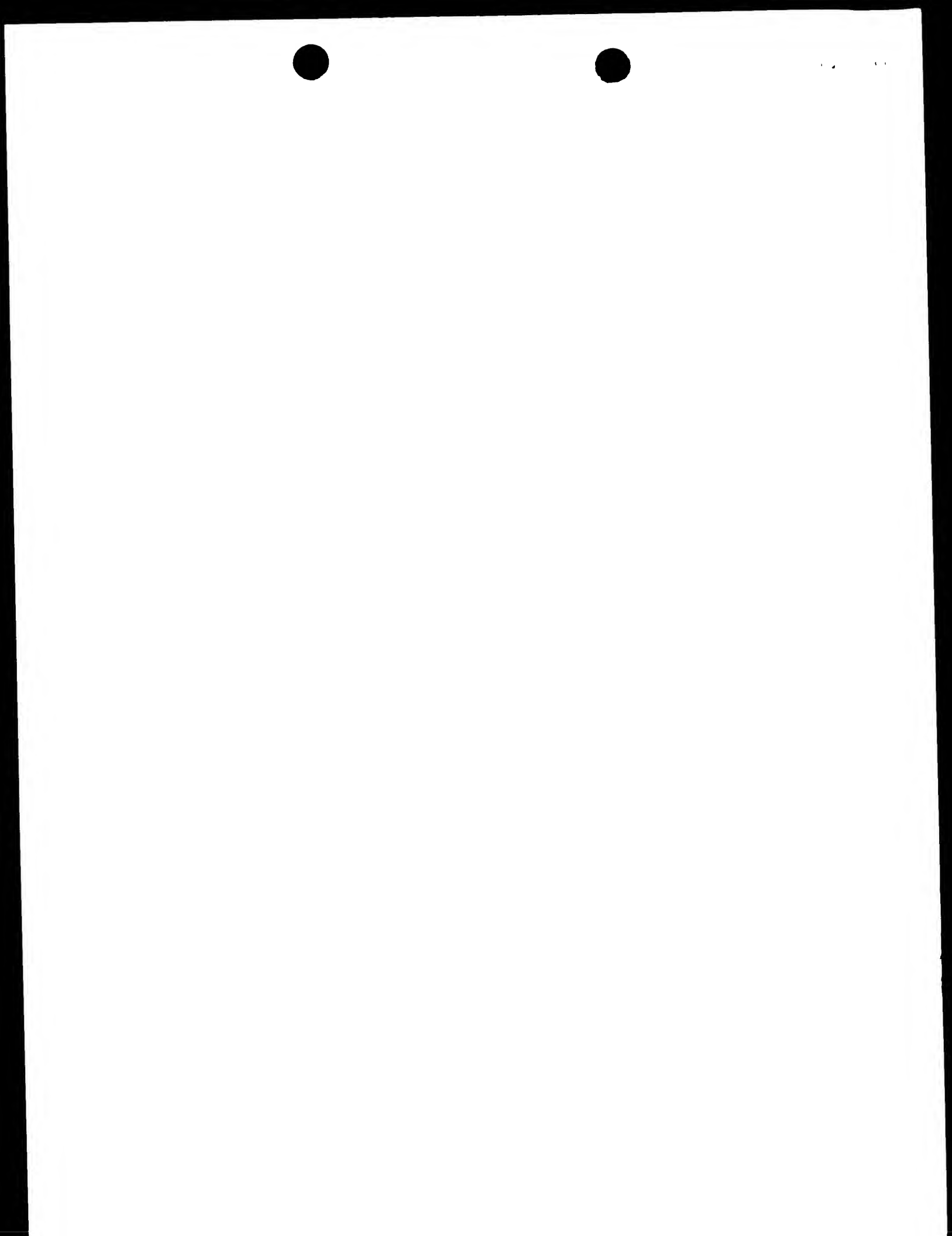
Gly Pro Tyr Pro Ala Ala Ala Pro Pro Leu Ser Ala Pro Asn Tyr Pro

65 70 75 80

Thr Ile Ser Arg Pro Leu Ile Cys Arg Phe Gly Tyr Gln Met Asp Glu

85 90 95

Ser Asn Gln Cys Val Asp Val Asp Glu Cys Ala Thr Asp Ser His Gln



100

105

110

Cys Asn Pro Thr Gln Ile Cys Ile Asn Thr Glu Gly Gly Tyr Thr Cys

115

120

125

Ser Cys Thr Asp Gly Tyr Trp Leu Leu Glu Gly Gln Cys Leu Asp Ile

130

135

140

Asp Glu Cys Arg Tyr Gly Tyr Cys Gln Gln Leu Cys Ala Asn Val Pro

145

150

155

160

Gly Ser Tyr Ser Cys Thr Cys Asn Pro Gly Phe Thr Leu Asn Glu Asp

165

170

175

Gly Arg Ser Cys Gln Asp Val Asn Glu Cys Ala Thr Glu Asn Pro Cys

180

185

190

Val Gln Thr Cys Val Asn Thr Tyr Gly Ser Phe Ile Cys Arg Cys Asp

195

200

205

Pro Gly Tyr Glu Leu Glu Glu Asp Gly Val His Cys Ser Asp Met Asp

210

215

220

Glu Cys Ser Phe Ser Glu Phe Leu Cys Gln His Glu Cys Val Asn Gln

225

230

235

240

Pro Gly Thr Tyr Phe Cys Ser Cys Pro Pro Gly Tyr Ile Leu Leu Asp

245

250

255



Asp Asn Arg Ser Cys Gln Asp Ile Asn Glu Cys Glu His Arg Asn His  
260 265 270

Thr Cys Asn Leu Gln Gln Thr Cys Tyr Asn Leu Gln Gly Gly Phe Lys  
275 280 285

Cys Ile Asp Pro Ile Arg Cys Glu Glu Pro Tyr Leu Arg Ile Ser Asp  
290 295 300

Asn Arg Cys Met Cys Pro Ala Glu Asn Pro Gly Cys Arg Asp Gln Pro  
305 310 315 320

Phe Thr Ile Leu Tyr Arg Asp Met Asp Val Val Ser Gly Arg Ser Val  
325 330 335

Pro Ala Asp Ile Phe Gln Met Gln Ala Thr Thr Arg Tyr Pro Gly Ala  
340 345 350

Tyr Tyr Ile Phe Gln Ile Lys Ser Gly Asn Glu Gly Arg Glu Phe Tyr  
355 360 365

Met Arg Gln Thr Gly Pro Ile Ser Ala Thr Leu Val Met Thr Arg Pro  
370 375 380

Ile Lys Gly Pro Arg Glu Ile Gln Leu Asp Leu Glu Met Ile Thr Val  
385 390 395 400



Asn Thr Val Ile Asn Phe Arg Gly Ser Ser Val Ile Arg Leu Arg Ile

405

410

415

Tyr Val Ser Gln Tyr Pro Phe

420

SEQ ID NO. : 15

Length : 1269 base pairs

Type : nucleic acid

Strandness : single

Topology : liner

Molecule type : cDNA to mRNA

Sequence Description :

CAGTGCACGA ATGGCTTTGA CCTGGATCGC CAGTCAGGAC AGTGTTTAGA TATTGATGAA 60

TGCCGAACCA TCCCCGAGGC CTGCCGAGGA GACATGATGT GTGTTAACCA AAATGGCGGG 120

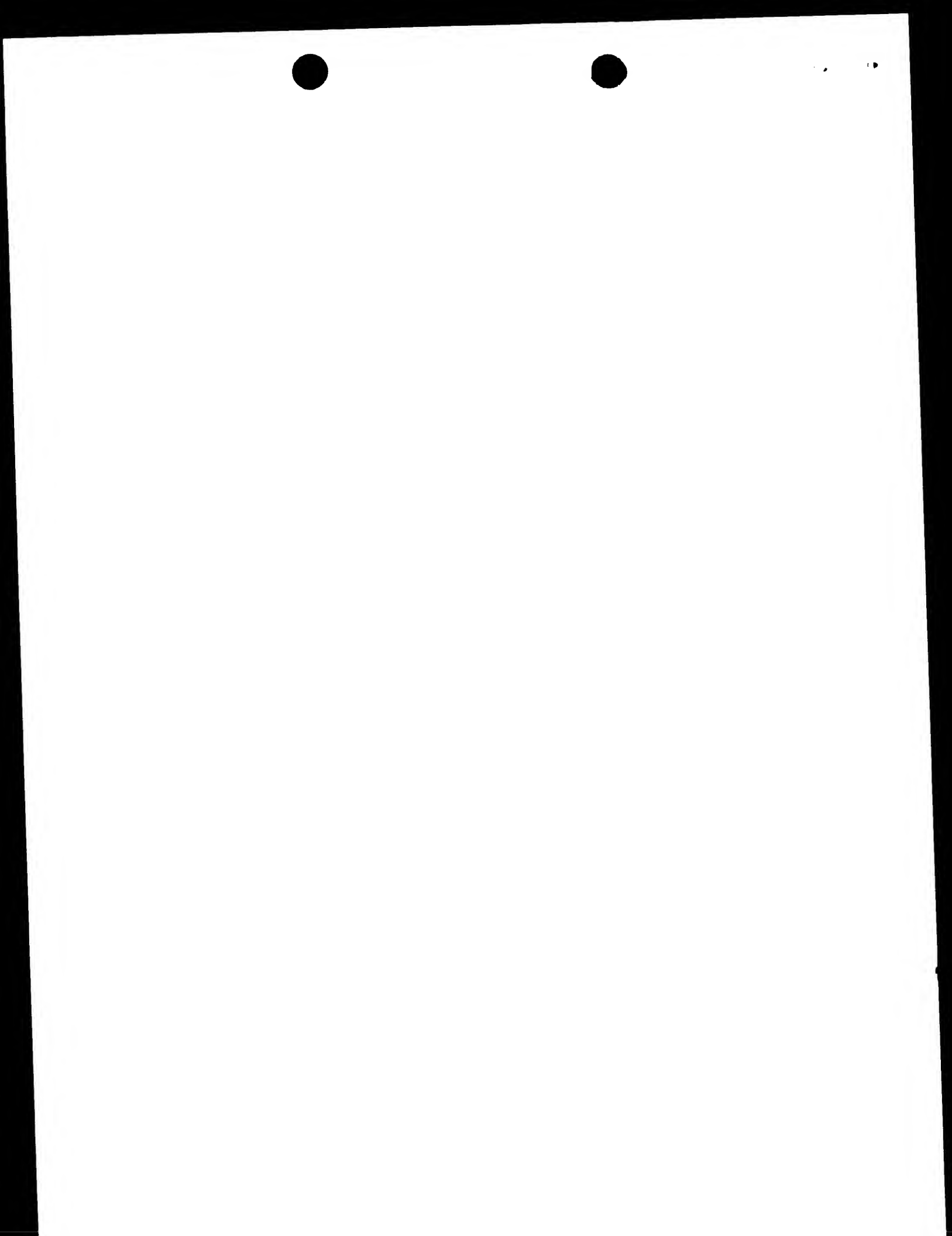
TATTTATGCA TTCCCCGGAC AAACCCTGTG TATCGAGGGC CCTACTCGAA CCCCTACTCG 180

ACCCCCTACT CAGGTCCGTA CCCAGCAGCT GCCCCACCAC TCTCAGCTCC AAATATCCC 240

ACGATCTCCA GGCCTCTTAT ATGCCGCTTT GGATACCAGA TGGATGAAAG CAACCAATGT 300

GTGGATGTGG ACGAGTGTGC AACAGATTCC CACCAGTGCA ACCCCACCCA GATCTGCATC 360

AATACTGAAG GCGGGTACAC CTGCTCCTGC ACCGACGGAT ATTGGCTTCT GGAAGGCCAG 420



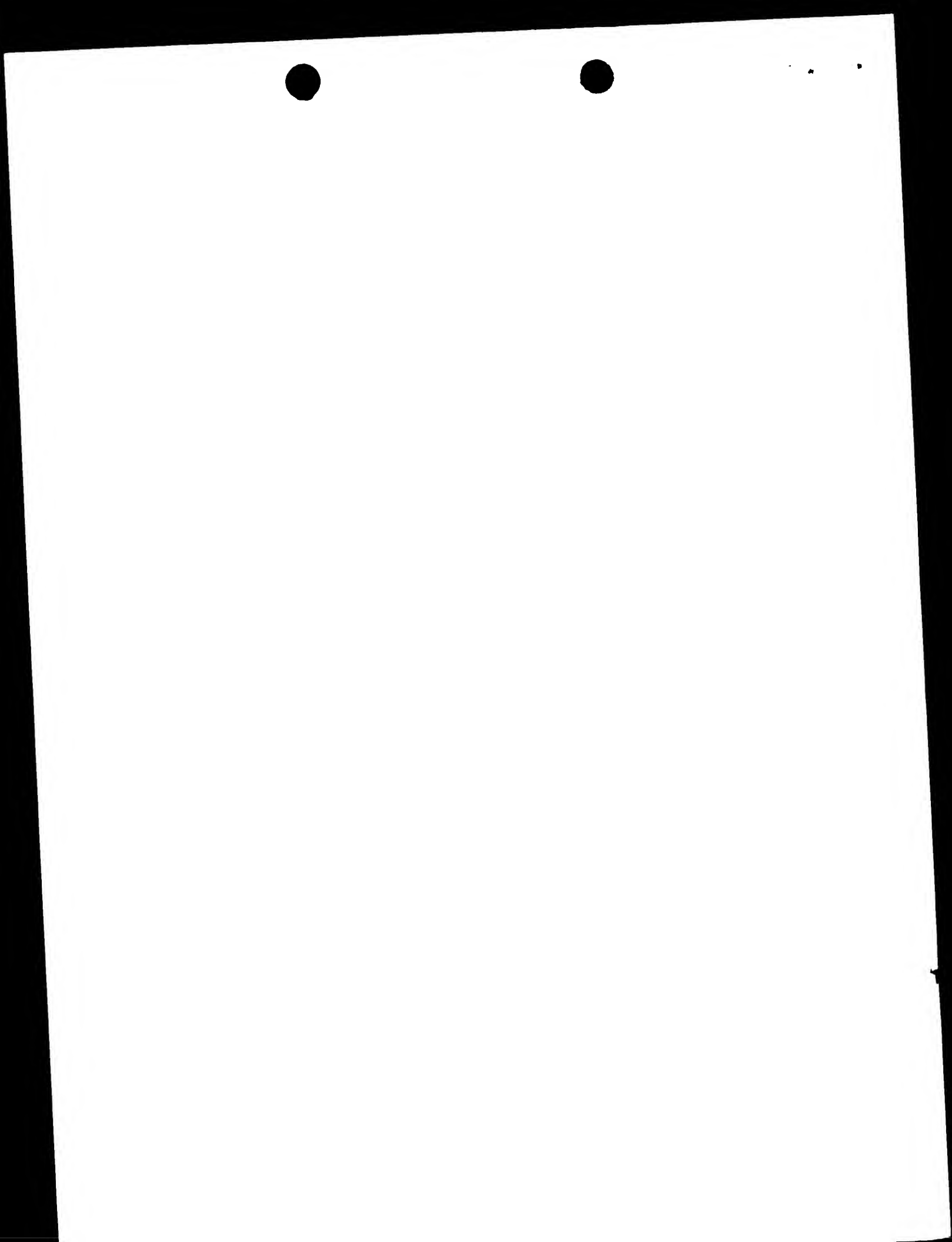


TGCTTAGACA TTGATGAATG TCGCTATGGT TACTGCCAGC AGCTCTGTGC GAATGTTTCCT 480  
 GGATCCTATT CTTGTACATG CAACCCTGGT TTTACCCTCA ATGAGGATGG AAGGTCTTGC 540  
 CAAGATGTGA ACGAGTGTGC CACCGAGAAC CCCTGCGTGC AAACCTGCGT CAACACCTAC 600  
 GGCTCTTTCA TCTGCCGCTG TGACCCAGGA TATGAACTTG AGGAAGATGG CGTTCATTGC 660  
 AGTGATATGG ACGAGTGCAG CTTCTCTGAG TTCCTCTGCC AACATGAGTG TGTGAACCAG 720  
 CCCGGCACAT ACTTCTGCTC CTGCCCTCCA GGCTACATCC TGCTGGATGA CAACCGAAGC 780  
 TGCCAAGACA TCAACGAATG TGAGCACAGG AACCACACGT GCAACCTGCA GCAGACGTGC 840  
 TACAATTTAC AAGGGGGCTT CAAATGCATC GACCCCATCC GCTGTGAGGA GCCTTATCTG 900  
 AGGATCAGTG ATAACCGCTG TATGTGTCCT GCTGAGAACC CTGGCTGCAG AGACCAGCCC 960  
 TTTACCATCT TGTACCGGGA CATGGACGTG GTGTCAGGAC GCTCCGTTCC CGCTGACATC 1020  
 TTCCAAATGC AAGCCACGAC CCGTACCCT GGGGCCTATT ACATTTTCCA GATCAAATCT 1080  
 GGGAATGAGG GCAGAGAATT TTACATGCGG CAAACGGGCC CCATCAGTGC CACCCTGGTG 1140  
 ATGACACGCC CCATCAAAGG GCCCCGGGAA ATCCAGCTGG ACTTGAAAT GATCACTGTC 1200  
 AACACTGTCA TCAACTTCAG AGGCAGCTCC GTGATCCGAC TGCGGATATA TGTGTCGCAG 1260



TACCCATTC

1269



Document Name: Abstract

Abstract

Constitution: Novel mouse and human polypeptide, a method for preparation of them, cDNAs encoding them, fragments capable to hybridizing them, a plasmid containing them, a host cell transformed with the plasmid, an antibody of the polypeptide, a pharmaceutical composition containing the polypeptide or antibody.

Effects: The polypeptide of the present invention possess an inhibitory activity on proliferation of vascular smooth muscle cells. So it is useful for the treatment of diseases induced by abnormal proliferation of smooth muscle, for example, arteriosclerosis, myosarcoma. It is also useful for the treatment and/or prevention of many kinds of diseases as the polypeptide have hematopoiesis regulating activity, tissue generation/regeneration activity, Activin/Inhibin activity, chemotactic/chemokinetic activity, hemostatic and thrombolytic activity, receptor/ligand activity etc.

Selected Fig.: none

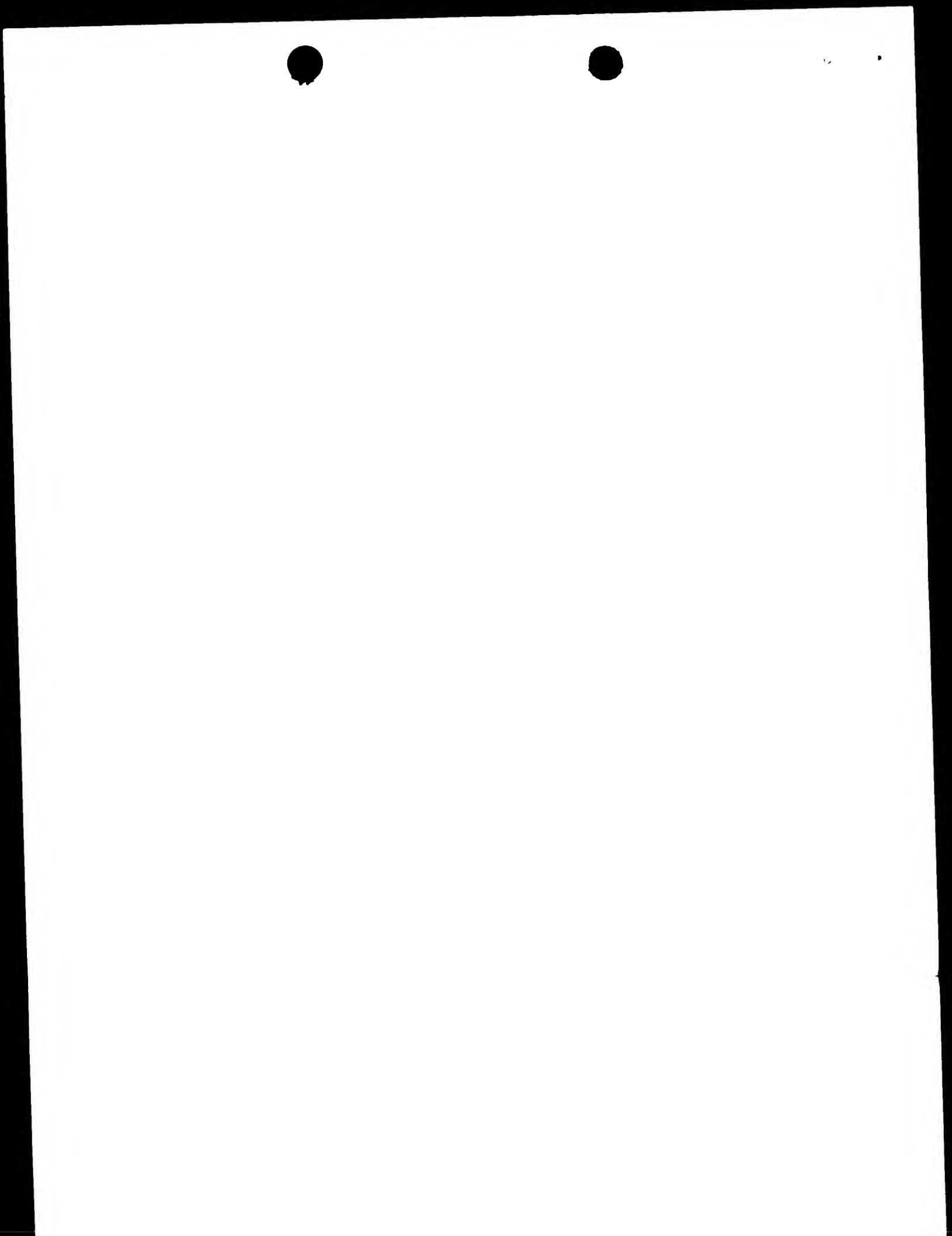
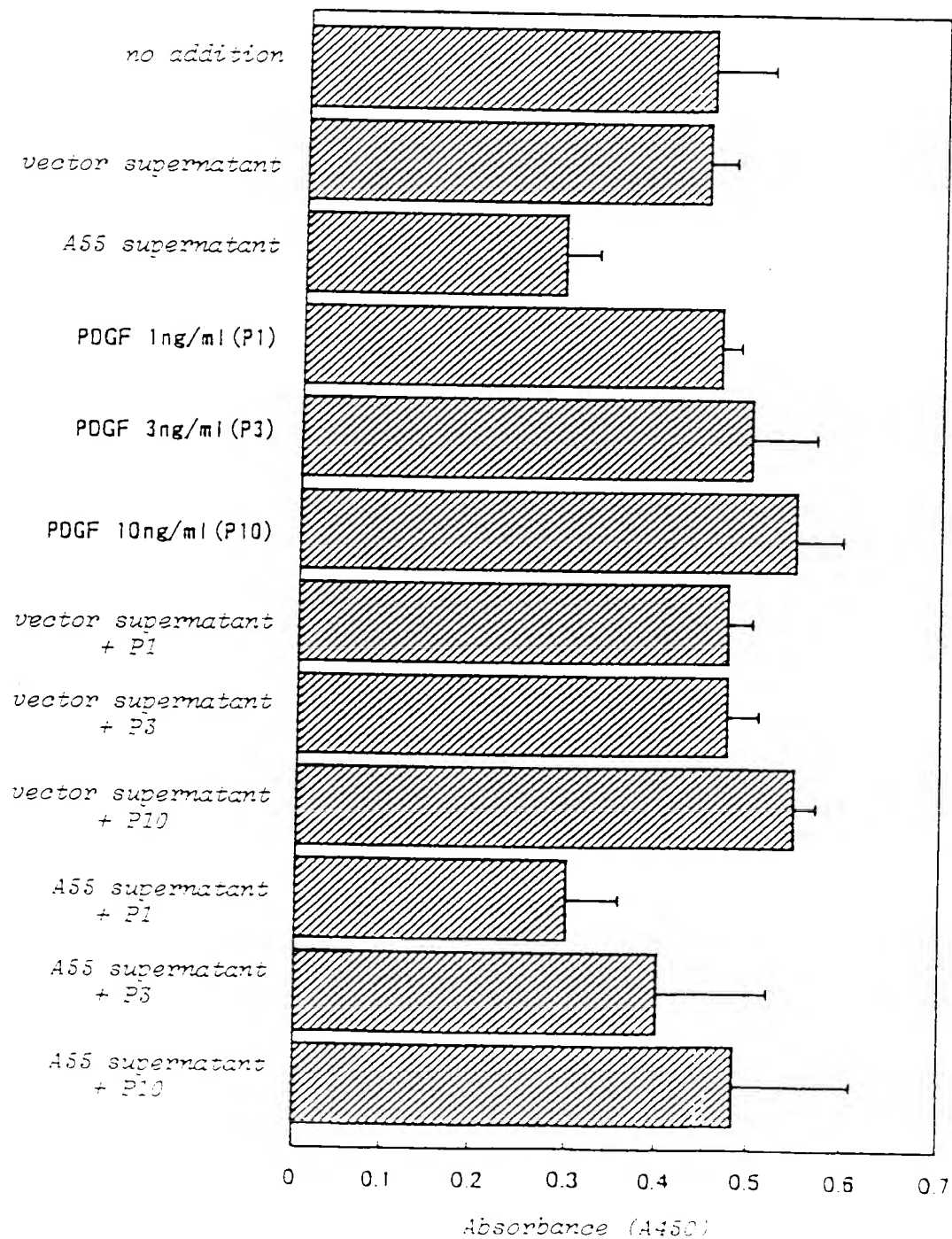


Fig. 1

Inhibitory activity of mouse A55 protein on proliferation of rat aortic vascular smooth muscle cells stimulated by PDGF



534 Rec'd PCT/PTO 30 OCT 2000